

Behandlung von Knochendefekten durch MSC mit optimierten knochenheilenden Eigenschaften

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Stefanie Elser (geb. Simon)

aus Stuttgart

Tübingen

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 08.12.2015

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hinnak Northoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

für meine Familie

*Man merkt nie,
was schon getan wurde;
man sieht immer nur das,
was noch zu tun bleibt.*

Marie Curie

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

PAPER (eingereicht bei *Transfusion*):

Isolation, expansion and characterization of Endothelial Colony-Forming Progenitor Cells derived from non-stimulated peripheral blood leukapheresis

Georg Siegel, Stefanie Elser, Ursula Hermanutz-Klein, Monika Hirlinger, Regine Bernhard, Hinnak Northoff, Richard Schäfer

POSTER:

Behandlung von Pseudarthrosen durch MSC mit optimierten knochenheilenden Eigenschaften (DRK- Forschungsseminar 2011)

Stefanie Elser, R. Schäfer, R. Kehlbach, N. Söldner, R. Klaffschenkel, G. Siegel, H. Northoff

ARTIKEL:

Zelltherapie zur Knochenregeneration, Seite 12- 13

Neue Therapien für die Regenerative Medizin (Eine Initiative der Gesundheitsregion REGINA), veröffentlicht durch BioRegioSTERN und dem ZRM- Zentrum für Regenerationsbiologie und Regenerative Medizin Tübingen

VORTRAG:

Stefanie Elser

Behandlung von Pseudarthrosen durch MSC mit optimierten knochenheilenden Eigenschaften im Rahmen des REGINA Status-Seminars 03.07.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	9
1.1 Knochen	12
1.1.1 Funktionen.....	12
1.1.2 Struktureller Aufbau.....	12
1.1.3 Vaskularisierung von Knochen	14
1.1.4 Knochenbildung.....	15
1.2 Klinische Problematik: Knochendefekte	16
1.2.1 Verzögerte bzw. ausbleibende Frakturheilung.....	17
1.2.2 Atrophie und hypertrophe Pseudarthrose.....	19
1.3 Ziel der Arbeit	20
1.3.1 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien: osteoinduktive, osteokonduktive und osteogene Eigenschaften	21
1.3.2 Tissue Engineering von Knochengewebe	23
1.3.3 Stadien der natürlichen Knochenheilung	28
1.3.4 Modell der Stadien der Knochenbildung auf synthetischen Trägern.....	29
1.3.5 Vaskularisierung von Trägern.....	32
1.3.6 Humane mesenchymale Stammzellen/ Stromazellen	35
1.3.7 Endothelzellen	42
1.3.8 Charakterisierung: Marker, Kriterien.....	43

Material und Methoden.....	47
1.4 Zellkultur	47
1.5 Isolation von BM-MSC: Dichtegradientenzentrifugation vs. Direktaussaat	47
1.5.1 Färbungen	49
1.6 Isolation von EPC aus Vollblut, Leukaphereseprodukten und Leukozytendepletionskegeln	52
1.6.1 Isolierung aus Vollblut	53
1.6.2 Isolierung aus Leukozytendepletionskegeln	53
1.6.3 Isolierung aus Leukapheresebeuteln.....	54
1.7 Verwendung von SAOS-2 Zellen.....	55
1.8 Expansion hMSC in verschiedenen GMP-grade Medien.....	55
1.9 Expansion von EPC.....	56
1.10 Expansion von Co-Kulturen von hMSC und EPC-Zellen	57
1.11 Expansion hMSC im Bioreaktor Z® RP 6000 GMP Breeder	58
1.12 Passagieren.....	59
1.13 Bestimmung der Population Doubling Time (PDT)	60
1.14 Einfrieren und Auftauen von Zellen	60
1.15 Untersuchung des <i>In vitro</i> - Differenzierungspotentials	61
1.15.1 Bestimmung des osteogenen Differenzierungspotentials humaner und oviner MSC.....	61
1.15.2 Korrelation bestimmter Oberflächenmarker mit einem hohen osteogenen Potential von hMSC-Populationen.....	63

1.15.3	Bestimmung des chondrogenen Differenzierungspotentials von humanen und ovinen MSC	63
1.15.4	Bestimmung des adipogenen Differenzierungspotentials hMSC/oMSC ...	65
1.15.5	Bestimmung des Angiogenesepotentials von EPCs mittels Tubeformation-Assay	66
1.15.6	DIL-Ac-LDL-Uptake	67
1.16	Besiedelungsstrategien für osteogene Trägermaterialien	68
1.16.1	Konventionelle Besiedelung	68
1.16.2	Vakuumbesiedelung	68
1.16.3	Besiedelung der Testmaterialien mittels Kanüle	69
1.17	Überprüfung der Besiedelungseffizienz	70
1.18	Zellvitalitätstest	70
1.18.1	CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	70
1.19	Zytotoxizitätstest	71
1.19.1	CytoTox96 ® Non-radioactive Cytotoxicity Assay	71
1.19.2	Zytotoxizitätstest mittels AlamarBlue-Assay	72
1.20	Osteogene Differenzierung auf Trägern	73
1.21	RNA-Isolierung	73
1.22	Flusszytometrie	74
1.23	Besiedelung synthetischer Knochenimplantate	75
1.23.1	Kollagen-/Mineralimplantate: HA,TCP,HA-TCP-Konstrukte	75
1.23.2	Nanogel®	76

1.23.3	Hydroxylapatit-Partikel (HA-Partikel)	77
1.23.4	TriHA+®- Kalziumphosphat Keramik.....	78
1.23.5	Ceraform®Revolution	78
1.23.6	Polyurethan-Schaum (PU-Schaum)	79
1.23.7	Osteovit®.....	81
1.23.8	Actifit®	81
1.24	Bestimmung der mechanische Stabilität mittels Rückstellkraftmessung ..	82
1.24.1	HA, TCP und HA-TCP Konstrukte	82
1.25	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	85
1.26	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen	85
1.27	Fixierung der Knochenersatzmaterialien	86
1.28	Anfertigen von Dünnschnitten.....	87
1.29	<i>In-vivo</i> -Testung: Großtierversuch am Schaf	88
1.29.1	Versuchstiere.....	90
1.29.2	Einteilung der Versuchsgruppen.....	92
1.29.3	Haltung und Versorgung der Versuchstiere.....	92
1.29.4	Zeitplan und Experimentelle Methodik des Tierversuchs	93
1.29.5	Experimentelle Methodik des Tierversuchs	94
1.29.6	Postoperatives Management	97
1.29.7	Röntgenologische Kontrolluntersuchungen	98
1.29.8	Sektion	98
1.29.9	Makroskopische Befunde / Histologie.....	99

1.29.10	Histologische Auswertung	99
1.30	Mikroarray.....	100
1.30.1	Screening nach hMSC-Populationen mit hohem osteogenem Potential .	100
1.30.2	Versuchsaufbau Mikroarray.....	101
1.30.3	Einfluss der Oberfläche auf die osteogene Differenzierung.....	103
1.30.4	Evaluierung der Genregulation der osteogen differenzierten Zellen im Vgl. zur undifferenzierten Negativkontrolle	104
Ergebnisse		105
1.31	Selektion von hMSC-Subpopulationen mit hohem osteogenem Potential	105
1.32	Selektion GMP-konformer Kulturmedien ohne FCS-Zusatz	111
1.33	Bioreaktor	113
1.33.1	Exemplarische Darstellung eines Reaktorlaufs mit MSC- Zellen von Spender 113, Passage 3	113
1.34	ECFC-Isolierung aus Leukaphereseprodukten (Kegel/ Beutel) bzw. aus Vollblut.....	114
1.35	Bestimmung der ECFC-Identität der isolierten Zellen.....	115
1.36	Co-Kultur ECFC/MSC.....	119
1.37	In-vitro Versuche mit Knochenersatzmaterialien	133
1.37.1	Kollagen-/Mineralimplantate: HA, TCP, HA-TCP-Konstrukte.....	133
1.37.2	Nanogel®	144
1.37.3	Hydroxylapatit-Partikel (HA-Partikel)	165

1.37.4	TriHA+-Würfel.....	169
1.37.5	CeraformRevolution®-Keramik.....	175
1.37.6	PU-Schaum I	179
1.37.7	PU-Schaum II: Modifizierter PU-Schaum	185
1.37.8	Actifit®.....	193
1.37.9	Osteovit®.....	195
1.38	<i>In-vivo</i> Anwendung im Schafmodell.....	197
1.38.1	Knochenmarkaspiration.....	197
1.38.2	Isolierung und Kultur der ovinen MSC	198
1.38.3	Charakterisierung der ovinen MSC.....	199
1.38.4	Seneszenz der ovinen MSC	201
1.38.5	Überprüfung der Vitalität der oMSC nach Besiedelung und Transport	203
1.38.6	Implantation und postoperative Beobachtungszeit	206
1.38.7	Vorbereitung des Implantationsbettes	207
1.38.8	Applikation des Prüfgegenstandes 1 und 2	209
1.38.9	Applikation des Referenzgegenstandes Osteovit®.....	213
1.38.10	Röntgenologische Befunde.....	215
1.38.11	Makroskopische Sektionsbefunde.....	229
1.38.12	Histologische Befunde.....	235
1.39	Mikroarray.....	235
1.39.1	Übersicht der Alizarinrotquantifizierungen von 20 MSC-Populationen: Auswahl der Spender MSC für das Mikroarray- Experiment	235

1.39.2	Funktionelle Gruppenanalyse	242
	Diskussion	247
	Zusammenfassung	261
	Summary	263
	Anhang	265
1.40	Übersicht FACS-Antikörper	265
1.41	Verbrauchsmaterialien.....	267
1.42	Chemikalien/ Reagenzien / Medien	268
1.43	Klein- und Großgeräte	270
	Abkürzungsverzeichnis	272
	Danksagung	277
	Literaturverzeichnis.....	279

Einleitung

Frakturheilungsstörungen stellen eine schwerwiegende Komplikation bei der Behandlung von Knochenbrüchen dar, bei der eine mangelhafte knöcherne Konsolidierung über den physiologischen Zeitraum hinaus vorliegt. Per Definition wird bei einer fehlenden Ausheilung von Knochendefekten bis zu 6 Monaten von einer verzögerte Frakturheilung gesprochen, während man eine darüber hinaus fortwährende Störung als Pseudarthrose bezeichnet (Raschke & Gasch, 2012). Pseudarthrosen stellen eine häufige und nach dem heutigen Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik aufwändige und oft nur mit mäßigem Erfolg zu behandelnde Komplikation nach einem chirurgisch oder traumatisch bedingten Knochendefekt dar. Die Folge dieser retardierten bzw. ausbleibenden Knochenheilung ist eine erhebliche kosten- und versorgungsrelevante Verzögerung der Wiedereingliederung des Patienten in seinen privaten oder beruflichen Alltag. Um eine komplikationsarme, vollständige Knochenheilung zu erzielen werden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Knochenersatzmaterialien auf ihre Eignung überprüft und in Kombination mit Stammzellen (MSC) getestet.

Humane adulte MSC aus dem Knochenmark (KM) weisen ein ausgeprägtes Potential zur Differenzierung in Richtung Knochengewebe (osteogen) auf und wurden bereits erfolgreich in der Behandlung von Knochendefekten eingesetzt (Bruder, Kraus, Goldberg, & Kadiyala, 1998; Cooper, Harris, Bruder, Kowalski, & Kadiyala, 2001; Petite H., 2000). Innerhalb von MSC-Präparationen lassen sich bestimmte Populationen mit unterschiedlichen morphologischen und funktionellen Eigenschaften identifizieren. Das osteogene Potential der MSC korreliert mit der

Kulturdauer und den Milieubedingungen (beispielsweise Kultur unter Hypoxie/ Normoxie) und Voruntersuchungen haben ergeben, dass nicht alle MSC *in vitro* gleich gut osteogen differenzieren. Deshalb sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Populationen von humanen, adulten MSC auf ihre Fähigkeit zur Knochenneubildung und zur Verbesserung der Durchblutung (Revaskularisierung) alleine sowie in Kombination mit endothelialen Vorläuferzellen (EPC) untersucht werden. Die physiologischen Bedingungen der MSC im Knochenmark beinhalten eine grenzwertige „Hypoxie“ (pO_2 von 55 mmHg) im Vergleich zum Sauerstoffanteil in trockener Raumluft (159 mm Hg). Weiterhin benötigen die MSC eine spezifische Ausrichtung in der dreidimensionalen Struktur des Knochen-Markraums. Aus diesem Grund wurden auch die Parameter Sauerstoffgehalt und dreidimensionale Ausrichtung in dieser Arbeit mit einbezogen. Funktionelle Testungen bezüglich Multipotenz der eingesetzten Zellen ergänzen die Analysen. Um Stammzellen, die *in vitro* expandiert wurden, auch klinisch anwenden zu können, gilt in der Bundesrepublik Deutschland (wie in zahlreichen anderen Ländern) das Gewebegesetz. Bei der Transplantation von MSC, die in tiereserumhaltigem Kulturmedium expandiert wurden besteht die Gefahr einer Übertragung von Infektionserregern und Prionen (WHO, Memorandum 1997). Diese können Auslöser für eine Variante der Kreuzfeldt-Jakob-Krankheit sein (Will et al., 1996). Zudem kann es durch den Kontakt mit tierischen Proteinen zu allergischen Reaktionen und lokalen Entzündungsreaktionen kommen (Selvaggi, Walker, & Fleisher, 1997) was zur Erforschung von alternativen, serumfreien Medien bzw. humaner Serumalternativen oder Thrombozytenlysat führte (Bieback, 2013; Vogel et al., 2006). Die vorliegende Arbeit untersucht, in wie weit mesenchymale Stammzellen unter tiereserumfreien Bedingungen expandiert und differenziert werden können.

Zur Entwicklung einer neuen Therapie wurden MSC isoliert, angereichert (durch Standardkulturverfahren bzw. Kultivierung der Zellen im Bioreaktor), auf bewährte und neue Trägermaterialien ausgesät und *in vitro* zu Knochenzellen (=osteogen) differenziert. Zudem wurde das knochenregenerierende Potenzial der MSC anhand spezieller osteogener Oberflächenmarker getestet und quantifiziert. Besonders gut osteogen differenzierende MSC wurden in Kombination mit verschiedenen Trägermaterialien, die die Knochenbildung fördern sollten, *in vitro* evaluiert und verbessert. Von den verschiedenen *in vitro* untersuchten Materialien wurde eines ausgewählt und für einen Mikroarrayversuch verwendet.

In präklinischen Untersuchungen am Tiermodell wurden die Eigenschaften der implantierten Zell-Trägerkonstrukte dann auch *in vivo* untersucht.

Die Prozesse wurden nach den Anforderungen der Good Manufacturing Practice (GMP) ausgerichtet, so dass bei Abschluss des Projekts alle Grundvoraussetzungen - außer klinischen Pilotstudien am Menschen - für die Einleitung eines Zulassungsverfahrens gegeben waren (verändert nach Projektbeschreibung: „Behandlung von Pseudarthrosen durch MSC mit optimierten knochenheilenden Eigenschaften“, BMBF-Projekt).

1.1 Knochen

1.1.1 Funktionen

Knochen bilden den größten Teil des Hartgewebes des menschlichen Körpers. Alle Knochen besitzen mechanische Schutzfunktion für zahlreiche vitale Strukturen des Körpers wie z.B. der Schädelknochen (Gehirn), die Rippen (Lungen, Herz) oder das Becken (Blase, innere Organe). Einige Knochen wie z.B. die Wirbelsäule oder der Beckenkamm bewahren ihre hämatopoetischen Funktionen bis zum Erwachsenenalter. Die Gesamtheit der Knochen dient auch als Kalziumreservoir und ist aktiv an der Kalzium-Homöostase im Körper beteiligt (Nather A., 2005).

1.1.2 Struktureller Aufbau

Makroskopisch betrachtet gibt es zwei unterschiedliche Knochenstrukturen. Der Knochen besteht normalerweise aus einer sehr dichten äußeren Schicht (Kortikalis, kortikaler Knochen), die einen weniger dichten schwammartigen, porösen Innenraum (Spongiosa, spongiöser Knochen) umgibt. Dieser Innenraum ist mit zähflüssigem, gelartigem Knochenmark gefüllt (Epple, 2003).

1.1.2.1 Chemische Zusammensetzung

Das Knochengewebe setzt sich zu 35% aus organischer und zu ca. 65% aus anorganischer Matrix zusammen (Posner, 1969). Der Hauptbestandteil der organischen Matrix ist das Strukturprotein Kollagen I, der übrige Anteil der

organischen Grundsubstanz setzt sich hauptsächlich aus Mukopolysacchariden (Proteoglykane und Glykosaminoglykane) zusammen (Posner, 1969). Die anorganische Matrix besteht aus Kalzium und Phosphat in Form von Hydroxylapatit (Summenformel: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) welcher durch extrazelluläre Ablagerung von Osteoblasten gebildet wird und für die außerordentliche Härte dieses Gewebes verantwortlich ist. Die besonderen mechanischen Eigenschaften des Knochens sind durch die Kombination aus organischen Komponenten (sorgen für hohe Zug- und Biegebelastung) und der anorganischen Mineralkomponente (kann hoher Druckbelastung standhalten) gegeben (Epple, 2003).

1.1.2.2 Zelluläre Bestandteile des Knochens

Beim Auf- und Abbau bzw. beim Umbau von Knochengewebe sind verschiedene Zellarten beteiligt. Diese werden nachfolgend näher beschrieben.

1.1.2.3 Osteogenese: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten

Knochen sind spezialisiertes Bindegewebe, welches aus zellulären Komponenten und extrazellulärer Matrix besteht. Man unterscheidet folgende drei Zelltypen: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Osteoblasten gehören zu den knochenbildenden Zellen, die sich dicht an dicht an der Knochenoberfläche befinden. Osteoblasten produzieren in einem zweistufigen Prozess die mineralisierte extrazelluläre Matrix. Zunächst kommt es zur Ausbildung eines unmineralisierten Gewebes, des sog. Osteoids, welches hauptsächlich aus

Kollagen besteht. Die Hohlräume sind zunächst mit Wasser gefüllt. Später erfolgt dann die Mineralisierung d.h. die Einlagerung von Kalziumphosphat unter Verdrängung des eingelagerten Wassers (Epple, 2003). Einen weiteren Zelltyp, die sog. Osteozyten, welche aus Osteoblasten hervorgegangen sind, findet man in fertigem Knochengewebe. Einzelne Osteozyten sind durch lange Zellfortsätze mit anderen Osteozyten verbunden. Sie sind vermutlich an der Regelung des Gleichgewichts zwischen Knochenauf- und abbau beteiligt.

Bei den knochenabbauenden Zellen, den sog. Osteoklasten handelt es sich um große, mehrkernige Zellen (Udagawa, Yamashita, Kobayashi, & Takahashi, 2011). Diese haften sich an der Knochenoberfläche fest und führen zu einer lokalen Auflösung des Knochens (Vaananen, Zhao, Mulari, & Halleen, 2000). Dieser Mechanismus beruht auf der Ansäuerung des pH-Werts auf ca. 4- 4.5, was zur Auflösung des Kalziumphosphats führt sowie der Ausscheidung spezieller Enzyme (Kollagenasen), welche das Kollagen abbauen. Im gesunden Organismus liegt stets ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und abbau vor, dieser kontinuierliche Prozess wird auch als sog. „Remodeling“ bezeichnet (Epple, 2003).

1.1.3 Vaskularisierung von Knochen

Die Blutversorgung von Knochengewebe ist über mehrere Arteriengruppen sowie den Blutabfluss über das venöse System gesichert. Das Knochengewebe beansprucht etwa 5- 10% des Herzminutenvolumens. Für die Blutversorgung langer Röhrenknochen sind insgesamt 3 Arteriengruppen beteiligt: die proximale / distale epiphysäre und metaphysäre Arterien, diaphysäre A. nutriciae sowie die periostale Arterien (siehe Abbildung 1). Die Äste dieser Arteriengruppen sind vielfach

miteinander verästelt, so dass sie sich gegenseitig substituieren können und ein Knocheninfarkt durch den Ausfall einzelner Gefäße inhibiert wird (Jerosch J., 2002).

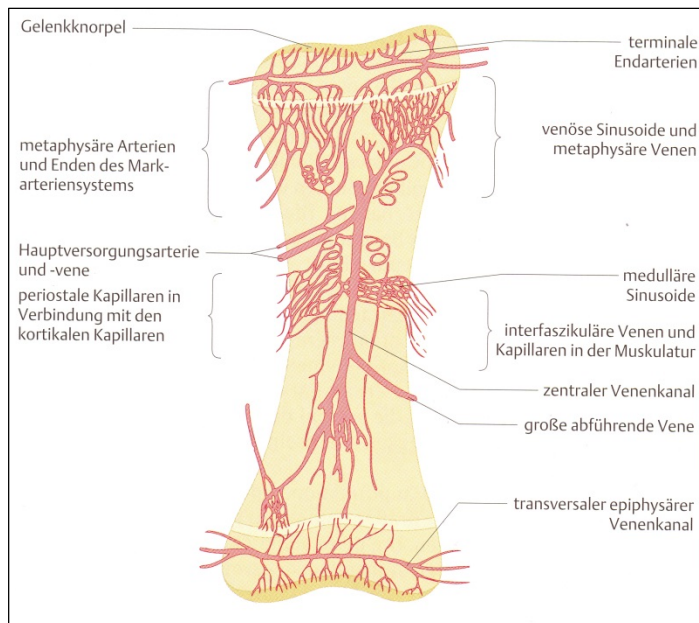


Abbildung 1: Gefäßversorgung des Knochens (Quelle: Knochen- curasan Taschenatlas, Thieme Verlag).

Das venöse System des Knochengewebes besitzt die 6- bis 8- fache Volumenkapazität des arteriellen Systems. Die Ableitung des Blutes erfolgt über die V. perforantes, die in die tieferen Extremitätenvenen mündet. Die Hauptvenengruppen verlaufen mit den jeweiligen Arterien (Jerosch J., 2002).

1.1.4 Knochenbildung

Bei der Knochenbildung wird zwischen zwei Arten, der direkten sowie der indirekten Knochenbildung unterschieden.

1.1.4.1 Direkte Knochenbildung

Die direkte Knochenbildung oder auch desmale Ossifikation läuft bei der initialen Knochenbildung in Embryonen ab (Epple, 2003). Hierbei führt die Ansiedelung von Osteoblasten in mesenchymalem Gewebe zur Knochenbildung. Die zunächst gebildete organische Phase (Osteoid) wird durch den Differenzierungsprozess der Osteoblasten schrittweise mineralisiert (Nather A., 2005).

1.1.4.2 Indirekte Knochenbildung

Bei dieser Form der Knochenbildung, der sog. endochondralen Ossifikation bilden Chondrozyten (Knorpelzellen) extrazelluläre Matrix, die sekundär verknöchert. Diese Form der Knochenneubildung findet man sowohl bei kurzen Knochen wie auch bei Röhrenknochen.

1.2 Klinische Problematik: Knochendefekte

Bei ungenügender Stabilisierung eines Knochenbruchs oder bei zu geringer Durchblutung infolge von Weichteilschäden kann es zu Störungen der Knochenheilung z.B. zur Ausbildung einer sogenannten Pseudarthrose kommen (Phillips F.M., 1997). Für die Heilung der Fraktur können verschiedene Materialien zum Knochenaufbau bzw. der Unterstützung der Knochendefektheilung eingesetzt werden. Die Materialien können verschiedenen Ursprungs sein z.B. autogen, allogenen, xenogen oder alloplastische Materialien. Während die Gabe von autogenem

Material momentan den „Goldstandard“ darstellt, sind doch einige Nachteile mit der Gewinnung spendereigenen Spongiosa, Beckenkammspan oder dem Segmenttransport von Knochensegmenten verbunden. Die Verfügbarkeit des Knochenmaterials ist limitiert und der Eingriff birgt zahlreiche Komplikationen an der Entnahmestelle wie etwa Weichteilinfektion, Osteomyelitis, Wund- und Knochenheilungsstörungen sowie Nachblutungen. Auch die Verwendung von allogenem oder xenogenem Knochentransplantaten ist mit zahlreichen Risiken für den Spender verbunden -wie etwa Immunreaktionen oder die Übertragung von pathogenen Prionen und Viren (Jerosch J., 2002). Daher wird und der Verwendung von alloplastischen Knochenaufbaumaterialien geforscht, die idealerweise osteokonduktive Eigenschaften besitzen und mit osteoinduktiven Agenzien wie Wachstumsfaktoren, thrombozytenreichem Blutplasma oder osteogenen Faktoren (Stammzellen bzw. Knochenmark) kombiniert werden können. Die Anwendung von körpereigenen MSC, welche ein hohes Regenerationsvermögen für die Knochenheilung haben, könnte die Heilung von solchen Knochendefekten verbessern (Petite H., 2000).

1.2.1 Verzögerte bzw. ausbleibende Frakturheilung

Das Ziel einer klinischen Knochenbruchbehandlung und Therapie ist ein vollständiges Wiedererlangen der Funktionalität des Knochens dh. eine dauerhaft mechanisch stabile und knöcherne Durchbauung des Defekts in einem möglichst kurzen Zeitintervall. In der Frakturbehandlung liegt die Anzahl auftretender Knochenheilungsstörungen trotz besserer Behandlungskonzepte und der Anwendung verfeinerter Osteosyntheseverfahren bei etwa 5% (Besch, Bielstein, Schuckart, &

Zenker, 1994; Kuner, Berwarth, & Lücke, 1996). Bei einigen Knochenbrüchen kommt es zu einer verzögerten (delayed union) bzw. einer ausbleibenden Frakturheilung (non-union), der sogenannten Pseudarthrose (Gomez-Barrena et al., 2014; Runkel & Rommens, 2000). Obgleich die Übergänge von der delayed-union zur Pseudarthrose fließend sind, wird bis zu einem Zeitraum von 6 bis 8 Monaten von einer verzögerten Knochenheilung gesprochen (Runkel & Rommens, 2000; Tscherne, 1996) und darüber hinaus von einer ausbleibenden Knochenheilung (non-union) bzw. Pseudarthrose (Beutler et al., 1999; Morrey & Wiedeman Jr, 1980). Während bei der verzögerten Knochenheilung (delayed union) keine operativen Maßnahmen eingeleitet werden müssen, da es sich hierbei lediglich um eine Verzögerung der Knochenfusion handelt, müssen bei der ausbleibenden Frakturheilung verschiedene Schritte eingeleitet werden. Diese können konservativer Natur sein z.B. Elektro-, Magnet- oder extrakorporale Stoßwellentherapie (Gollwitzer et al., 2013; McCormack, Lane, & McElwain, 1996; Vogel, Rompe, Hopf, Heine, & Bürger, 1997) jedoch werden in den meisten Fällen operative Maßnahmen zur Behebung des Defekts eingesetzt (Gollwitzer, Brandner, & Gloeck, 2006; Runkel & Rommens, 2000). Der Begriff der Pseudarthrose wird im Allgemeinen nicht nur im Zusammenhang mit dem Ausbleiben einer Frakturheilung mit bindegewebig aufgefülltem Frakturspalt gewählt, sondern dient auch für die Beschreibung einer „Falschgelenkbildung“ mit Neokapsel und Synovialflüssigkeit (Gollwitzer et al., 2006). In dieser Arbeit wird der Begriff der Pseudarthrose synonym zum Ausbleiben einer Frakturheilung verwendet.

1.2.2 Atrophe und hypertrophe Pseudarthrose

Im Allgemeinen wird zwischen einer atrophen und einer hypertrophen Pseudarthrose unterschieden. Bei der atrophen Pseudarthrose liegt in der Regel eine schwer gestörte lokale Perfusion und/oder ein knöcherner Defekt vor, daher ist meist eine operative Anfrischung der noch durchblutenden Fragmente erforderlich. Zusätzlich wird die Dekortikation über 5 bis 6 cm am proximalen und distalen Hauptfragment empfohlen (Kuner et al., 1996). Dagegen besteht bei der sog. hypertrophen Pseudarthrose im wesentlichen ein Mangel an Stabilität. Ein Anfrischen und/oder Resezieren des Pseudarthrosegewebes ist nicht erforderlich (Rompe, Eysel, Hopf, Vogel, & Küllmer, 1997).

Die Ursachen für eine gestörte Knochenheilung mit ausbleibender Frakturheilung sind meistens lokale Durchblutungsstörungen, d.h. eine mangelnde Gefäßversorgung, eine Frakturinstabilität und der mangelnde Kontakt der Knochenfragmente zueinander (Gollwitzer et al., 2006; Stürmer, 1996). Die Operation beinhaltet neben einer stabilen Osteosynthese häufig auch die Stimulation des Knochenwachstums mit autologen Transplantaten, Knochenersatzmaterialien oder den Einsatz von Wachstumsfaktoren (Gollwitzer et al., 2006) oder Stammzellen. Gleichzeitig erfolgt eine Anfrischung der Knochenenden mit Aufbrechen der Sklerosezone zur Förderung der Blutgefäßeinsprossung (Gollwitzer et al., 2006). Die Erfolgsraten der operativen Therapie liegen zwischen 75% (Friedlaender et al., 2001) und 100% (Kabak, Halici, Tuncel, Avsarogullari, & Karaoglu, 2004; Wu, Shih, Chen, & Tai, 1999). Neben den Operationsrisiken treten bei der autologen Spongiosaplastik auch Begleitmorbidität mit Komplikationsraten bis 20% auf (Damien & Parsons, 1991; Younger & Chapman, 1989).

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Zelltherapeutikums zur Behandlung von nicht heilenden Knochendefekten (non-union). Knochentransplantate werden für die Rekonstruktion einer Vielzahl an angeborenen, traumatischen und post-onkologischen Knochendefekten benötigt (Calvert, Weiss, & Sundine, 2003). Hierzu sollte das Potential verschiedener Populationen von regenerationskompetenten MSC auf ihre Eignung zur Behandlung von Knochendefekten untersucht werden. Nach der Identifizierung und Charakterisierung der optimal geeigneten MSC-Populationen von verschiedenen Spendern wurden diese auf bewährten und neuen osteokonduktiven Trägermaterialien vermehrt und osteogen differenziert. Diejenigen hMSC-Populationen, die *in vitro* das beste osteogene Potential (bestimmt durch quantitative Mineralisierungsversuche) zeigten, wurden für ein Mikroarray-Experiment mit einem ausgewählten Trägermaterial (Polyurethan-Schaum, Fa. Aesculap) eingesetzt. Es wurden Unterschiede in der 2D- und 3D-Kultur verglichen (Kulturflasche vs. 3D-Trägermaterial) sowie die Genexpression der fünf Spenderpopulationen in Kulturmedium vs. osteogenem Medium. Am Tiermodell (Schaf) wurde die klinische Eignung zur Knochenneubildung des ausgewählten Testmaterials (Polyurethan-Schaum, Fa. Aesculap) dann auch *in vivo* nach der Implantation über einen Zeitraum von mehreren Monate untersucht.

1.3.1 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien: osteoinduktive, osteokonduktive und osteogene Eigenschaften

Osteokonduktivität beschreibt die Eigenschaft eines Materials, das Einwachsen von Kapillaren, perivaskulärem Gewebe und Knochenzellen in den Defektraum zu erleichtern. Das Material übernimmt die Funktion einer „Leitschiene“. Einige Materialien besitzen auch osteoinduktive Eigenschaften d.h. sie haben die Fähigkeit die Umwandlung undifferenzierter mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoprogenitor-Zellen mit anschließender Osteogenese zu begünstigen (Jerosch J., 2002). Die Knochenbildung wird gefördert durch das osteogene Potential viabler Zellen wie Stammzellen, Osteoblasten und Osteozyten (Niemeyer et al., 2004).

Es existieren zahlreiche klinisch getestete Knochenersatzprodukte verschiedenen Ursprungs wie z.B. korallines Hydroxylapatit, Kollagen-basierte Matrices, Kalziumphosphat- bzw. Kalziumsulfat Produkte oder bioaktives Glas (Garrido, Lobo, Turibio, & Legeros, 2011; Khan, Yaszemski, Mikos, & Laurencin, 2008). Alle aufgeführten Produkte besitzen osteokonduktive (= tragende) Eigenschaften, wird jedoch kein osteoinduktives Agens wie Wachstumsfaktoren (z.B. bone morphogenetic proteins, BMPs) zugeführt, besitzen die Knochenersatzmaterialien keine Osteoinduktivität (Hak et al., 2007). Die osteokonduktiven Eigenschaften sind von entscheidender Bedeutung bei der Überbrückung größerer Knochendefekte (Frakturspalt > 1 cm oder nicht spontan selbst heilenden Frakturen). Überschreitet der Frakturspalt eine bestimmte kritische Größe, kann eine Knochenregeneration bzw. Frakturheilung, ohne Zugabe eines Knochenersatzmaterials zur Auffüllung des Defekts, nicht mehr stattfinden und es kommt zu keiner Frakturüberbrückung (Petite H., 2000). Therapeutisch wird der Frakturspalt durch ein osteokonduktives Material

ausgefüllt, was zu einer schnellen, zellbasierenden Frakturheilung führt (Desai, 2007). Idealerweise besitzen osteokonduktive Materialien eine ähnliche Porengröße wie spongiöser Knochen von etwa 150 - 600 μm (Desai, 2007). Studien zur Porengröße zeigen, dass bei kleinen Porengrößen von 15- 50 μm eher ein Einwachsen von fibrovaskulärem Gewebe stattfindet, Porengrößen von 50 -150 μm fördern die Osteoid-Bildung und Porengrößen >150 μm fördern das Einwachsen von mineralisiertem Knochen (Hulbert et al., 1970; Kasten et al., 2008; Klawitter, Bagwell, Weinstein, & Sauer, 1976). Die Größe und Regelmäßigkeit der Poren ist ein kritischer Faktor im Design eines keramischen Implantates da nicht nur eine ausreichende Porengröße für das Einwachsen von neuem Knochengewebe gegeben sein muss, sondern auch die Stabilität des Implantates zu berücksichtigen ist. Große Poren werden für das Einwachsen der Zellen benötigt, jedoch gewährleisten kleinere Porengrößen Druckstabilität - somit muss zwischen diesen beiden Faktoren abgewogen werden (Uchida, Nade, McCartney, & Ching, 1984). Die therapeutische Anwendung von MSC für die Knochenheilung erfordert eine Optimierung der Trägermaterialien nicht nur hinsichtlich der Porengröße sondern auch anderer Faktoren des Trägermaterials wie der Geometrie, biologische Aktivität, Festigkeit und Resorptionsrate. Hier muss zwischen biologischen Anforderungen für die Zellen und klinisch anwendbaren Matrices abgewogen werden (Cooper et al., 2001; Lee & Atala, 2013; Vunjak-Novakovic & Radisic, 2004).

1.3.2 Tissue Engineering von Knochengewebe

Das orthopädische Tissue Engineering mit Zellen begann bereits vor über 300 Jahren. Die erste dokumentierte Knochentransplantation wurde 1668 durch den dänischen Arzt Job-Van Meek`ren durchgeführt. Er transplantierte einem Soldaten, der an einer Schädelfraktur litt, ein Stück eines Hundeschädelknochens. Das Xenotransplantat wurde jedoch nach zwei Jahren auf Wunsch des Soldaten wieder entfernt damit dieser in seine Kirche zurückkehren konnte welche ihn wegen des Transplantats exkommuniziert hatte (De Long et al., 2007). Tavassoli und Crosby zeigten später in ihren Experimenten, dass ein angeborenes osteogenes Potential mit Knochenmark assoziiert ist (Tavassoli & Crosby, 1968). Die beiden Pioniere Albee und Phemister zeigten den Nutzen von transplantiertem Knochen für die Heilung von Frakturen und Knochendefekten, deren Techniken der autologen Transplantation bis heute fast unverändert angewandt werden (Hernigou & Homma, 2012). Seit dem wurden viele Experimente mit autologem, allogenen und synthetischen Knochengewebe getätigt (Miyazaki, Tsumura, Wang, & Alanay, 2009). Die fortschreitenden Erkenntnisse der Knochenzellbiologie, die Verfügbarkeit von hoch reinen Peptidwachstumsfaktoren sowie die Möglichkeit hoch spezialisierte Knochenersatzmaterialien zu fertigen haben zu einem rasanten Fortschritt im Bereich der Knochentransplantation und Knochenregeneration geführt (Hernigou & Homma, 2012).

Das Tissue Engineering von Knochengewebe ist bis heute ein interdisziplinäres Feld, an welchem sowohl Ärzte, Wissenschaftler als auch Ingenieure arbeiten. Im Zentrum dieser Forschung steht ein Knochenersatzmaterial, welches hohe klinische Anforderungen erfüllen muss. Das Material besitzt idealerweise Eigenschaften wie

eine gute Verfügbarkeit, niedrige Kosten, hohe Anpassbarkeit an den jeweiligen Knochendefekt, gute Materialverträglichkeit sowie gute osteoinduktive Eigenschaften für eine vollständige Knochenregeneration. Der momentane „Goldstandard“ für das Auffüllen von Knochendefekten ist die Verwendung von autologem Knochengewebe (Damien & Parsons, 1991). Es gibt inzwischen auch Ansätze dieses autologe Material mit synthetischem Knochenersatzmaterial (Manso & Wassal, 2010) oder mit Allomaterial (An, Lynch, & Toth, 1995; Jorgenson, Lowe, France, & Sabin, 1994) zu kombinieren.

Beim Tissue Engineering von vaskularisiertem Knochengewebe – sowohl von autologem wie auch allogenenem Knochenmaterial- steht man einer Vielzahl von Problemen gegenüber. Die Zellen auf dem Knochentransplantat müssen in der oftmals vorgeschädigten Umgebung des Knochendefekts überleben und funktionell aktiv bleiben. Bei kleineren Knochendefekten mit günstigem Wundbett werden eher nicht-vaskularisierte spongiöse Knochenstücke, die vom Beckenkamm, dem Schienbein oder der Speiche stammen eingesetzt. Bei größeren Knochendefekten mit Überbrückung größerer Abstände oder einer ungünstigen Umgebung, wie sie beispielsweise nach Bestrahlungen bei post-onkologischen Resektionen vorliegt, werden eher vaskularisierte Knochentransplantate benötigt (z.B. aus dem Wadenbein). Jeder autologe Eingriff ist jedoch für den Patienten mit verschiedenen Risiken behaftet wie Schmerzen, Fehlbildungen, Infektionsrisiko, Funktionsverlust, Verletzung von angrenzenden Strukturen, Nervenschädigung, Operationsrisiken (Narkose), Narbenbildung sowie längeren Klinikaufenthalten (Calvert et al., 2003; Damien & Parsons, 1991). Die Verfügbarkeit von autologem Knochengewebe ist zudem begrenzt und die Morbidität an der Entnahmestelle beträgt bis zu 25% (Arrington, Smith, Chambers, Bucknell, & Davino, 1996; Heary, Schlenk, Sacchieri,

Barone, & Brotea, 2002; Laurie, Kaban, Mulliken, & Murray, 1984; Younger & Chapman, 1989). Eine Alternative ist die Verwendung von Allotransplantaten. Diese haben osteokonduktive Eigenschaften und können auch ergänzend zu autologen Transplantaten verwendet werden. Die allogene Knochentransplantation birgt jedoch wie andere Gewebeübertragungen oder Transfusionen das Risiko in sich, dass zusammen mit dem Gewebe Krankheitserreger wie Viren übertragen werden (Li, Ho, & Liu, 2001; Simonds et al., 1992). Das Risiko einer Ansteckung mit dem HI-Virus beträgt dabei statistisch 1: 1 500 000, mit Hepatitis C 1: 60 000 und mit Hepatitis B 1: 100 000 (Laurencin, Khan, & El-Amin, 2006). Daher müssen durch Auswahl der Spender (körperliche Untersuchung, Laboruntersuchungen, Anamnese) und sachgerechte Aufbereitung der Explantate die Risiken der Krankheitsübertragung zum Schutz des Empfängers minimiert werden (aus Richtlinien zum Führen einer Knochenbank, Bundesärztekammer Deutschland und (Tomford, 2000). Die Behandlung des Allomaterials (z.B. durch Sterilisation, Gefriertrocknung, Bestrahlung) kann jedoch auch zur Zerstörung der residenten osteogenen Zellen und zur Denaturierung von Proteinen (Hallfeldt, Kessler, Puhlmann, Mandelkow, & Schweiberer, 1992; Voggenreiter, Ascherl, Fruh, Blumel, & Schmit-Neuerburg, 1995) und damit zum Verlust der osteoinduktiven Eigenschaften führen. Das Allomaterial hat daher hauptsächlich „Gerüstfunktion“ (osteokonduktive Eigenschaften). Wird ein osteokonduktives Material zum Auffüllen eines Knochendefekts gewählt, müssen für eine effektive Knochenneubildung auch zelluläre Faktoren (Knochenmark, MSC bzw. Osteoblasten) zugegeben werden oder das Knochenersatzmaterial unmittelbar an Regionen mit Knochenmark angrenzen (Hatzokos, Stavridis, Iosifidou, Karataglis, & Christodoulou, 2011; Nather, David, Teng, Lee, & Pereira, 2010; Ouyang et al., 2006; Uchida et al., 1984) oder aber eine Kopplung mit osteogenen Wachstumsfaktoren

wie BMP-2 erfolgen (Cuomo, Virk, Petrigliano, Morgan, & Lieberman, 2009; Kim, Wozney, & Li, 2004; Laffargue et al., 1999). Große Knochendefekte können nicht allein durch ein osteokonduktives Material geheilt werden, es müssen osteoinduktive oder sogar osteogene Faktoren vorhanden sein. Das osteogene Potential ist ausschließlich durch viable Zellen gegeben (Niemeyer et al., 2004). In Kombination mit frischem Knochenmarkaspirat kann beispielsweise die Knochenneubildung deutlich verbessert werden und es kommt zu signifikant höheren Fusionsraten im Kaninchenmodell (Tay, Le, Heilman, Lotz, & Bradford, 1998). Dieser positive Effekt von Knochenmarkaspirat bzw. MSC auf die Knochenheilung konnte aber auch in klinische Studien am Mensch gezeigt werden (Hauzeur & Gangji, 2010; Hendrich, Franz, Waertel, Krebs, & Jager, 2009; Hernigou, Poignard, Zilber, & Rouard, 2009; Jager et al., 2010; Jager et al., 2009; Zamzam et al., 2009).

Aus Allomaterial kann durch Säureextraktion ein Produkt hergestellt werden, die demineralisierte Knochenmatrix (DBM). Die DBM besteht aus Typ 1 Kollagen, welches ein osteokonduktives Grundgerüst bildet aber auch osteoinduktive Faktoren besitzt (Gazdag, Lane, Glaser, & Forster, 1995; Gebhart & Lane, 1991) wie knochenmorphogenetische Proteine (BMPs), Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF), Platelet-derived growth factor (PDGF) und transforming growth factor β (TGF- β) (De Long et al., 2007; Toolan, 2006). Diese Wachstumsfaktoren fördern die Chemotaxis und Proliferation mesenchymaler Stammzellen und Osteoblasten und begünstigen so die Knochenheilung (Lind et al., 1995). BMPs wurden 1965 erstmals beschrieben (Urist, 1965) als eine Substanz im Knochen, die in der Lage ist die Knochenbildung anzuregen. Früher war es sehr schwierig eine größere Menge des BMP-Proteins aus Knochen zu extrahieren, da es nur 0,1% des Gesamtgewichts aller Knochenproteine ausmacht. Außerdem wird es

erst verfügbar, wenn die Knochenmatrix in demineralisierter Form vorliegt (Urist, Silverman, Buring, Dubuc, & Rosenberg, 1967; Urist & Strates, 1970). Heute ist es möglich verschiedene BMP-Proteine rekombinant ohne immunogene Eigenschaften zu synthetisieren. Der positive Effekt der beiden rekombinanten BMP-Proteine rhBMP-2 und BMP-7 (osteogenic protein 1) wurde schon ausführlich in tierischen Studien belegt (Blatter et al., 2002; Boden, Martin, Morone, Ugbo, & Moskovitz, 1999; Jenis, Wheeler, Parazin, & Connolly, 2002; Salamon, Althausen, Gupta, & Laubach, 2003). Diese beiden BMP-Proteine sind auch bereits erfolgreich in klinischen Studien am Menschen eingesetzt worden (Baskin, Ryan, Sonntag, Westmark, & Widmayer, 2003; Johnsson, Stromqvist, & Aspenberg, 2002; Vaccaro et al., 2008; Vaidya et al., 2007). Die Wirkungsweise der BMP-Proteine basiert auf der Bindung der BMP-Proteine an Rezeptoren auf der mesenchymalen Stammzellmembran, was zur Aktivierung eines intrazellulären Signalwegs führt. Mesenchymale Stammzellen differenzieren dadurch zu gewebsspezifischen Vorläuferzellen und können zur Produktion von extrazellulärer Knochenmatrix angeregt werden (De Long et al., 2007). Aus der großen Familie der BMPs sind momentan nur zwei BMPs klinisch zugelassen (BMP-2 und BMP-7). Es gibt aber auch Kontraindikationen bei der Anwendung von BMPs diese sind z.B. Schwangerschaft, Malignome, ein unausgereiftes Skelettsystem oder aber vorangegangene Knochentumore. Des Weiteren sind die hohen Kosten der BMP-Produkte ein limitierender Faktor für deren Verwendung (Desai, 2007).

1.3.3 Stadien der natürlichen Knochenheilung

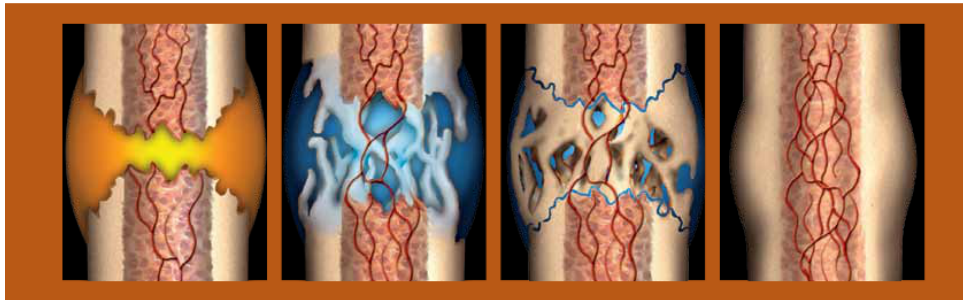


Abbildung 2: Stadien der Knochenheilung: Inflammation, Bildung eines weichen Kallusgewebes, Bildung eines harten Kallusgewebes, Remodelling (Quelle: Exogen).

Wie in Abbildung 2 dargestellt, werden bei der regelrechten Frakturheilung vier verschiedene, sich überlappende Stadien durchlaufen (Beckmann et al., 2014). Kurz nachdem es zum Knochenbruch kommt, entwickelt sich durch die Schädigung der Blutgefäße und der darauf folgenden Aktivierung der Gerinnungskaskade ein Hämatom an der verletzten Stelle. Inflammatorische Leukozyten und Makrophagen sowie Stammzellen wandern in den Wundbereich ein und bilden pro-inflammatorische Moleküle, die die Heilung initiieren und zur Ausbildung von neuen Blutgefäßen führen (Angiogenese). Diese inflammatorische Reaktion ist verbunden mit Schmerzen, Überwärmung und Ödembildung und führt zur Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine, die eine wichtige Funktion bei der Frakturheilung besitzen. Im zweiten Stadium der Frakturheilung wird ein weiches Kallusgewebe gebildet. Die Entzündung, die durch pro-inflammatorischen Signalmoleküle induziert wird, führt zur Zellteilung und dem Einwachsen neuer Blutgefäße. Bei einem dieser Zelltypen handelt es sich um Chondrozyten, welche Kollagen und Proteoglykane sezernieren und so einen Bindegewebsknorpel ausbilden, den sog. weichen Kallus. In der darauffolgenden Phase der Frakturheilung wird das weiche Kallusgewebe durch endochondrale Ossifikation der Chondrozyten und direkter Knochenneubildung (durch mesenchymale Stammzellen) in

Geflechtknochen umgewandelt. So entsteht ein harter Kallus um die gebrochenen Frakturrenden. Im letzten Stadium der Frakturheilung kommt es zum sog. „Remodeling“-Prozess. Mechanisch harter, hoch organisierter kortikaler Knochen ersetzt nach einiger Zeit den labilen Geflechtknochen. Da es sich bei der Knochenheilung um einen kontinuierlichen Erneuerungsprozess handelt, heilt das Knochengewebe langfristig ohne Narbenbildung.

1.3.4 Modell der Stadien der Knochenbildung auf synthetischen Trägern

Es gibt verschiedene Möglichkeiten des Körpers auf implantierte synthetische bzw. auch allogene oder autogene Implantate zu reagieren. Im schlechtesten Fall ist das implantierte Material toxisch, so dass das Gewebe rund um den Implantationssitus abstirbt. Handelt es sich um nicht-toxisches Material welches aber biologisch inaktiv (inert) ist, so kommt es zur Ausbildung einer mehr oder weniger dicken Bindegewebsschicht. Ist das implantierte nicht-toxische Material zudem biologisch aktiv, so entwickelt sich ein Zusammenschluss an der Grenzfläche zwischen Implantat und Gewebe. Der klinisch beste Fall liegt vor, wenn ein Knochenersatzmaterial nicht-toxisch ist und zudem biologisch degradierbar, so kann das umliegende Gewebe Schritt für Schritt das Implantat ersetzen (Nuss & von Rechenberg, 2008). Muschler et al. (2004) zeigen in den nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 3 bis Abbildung 5) die Immunreaktion des Körpers auf einen nicht-toxischen, synthetischen Träger. Hierbei werden die verschiedenen Stadien der Zellbesiedelung eines porösen, implantierten Trägermaterials mit anschließender Knochenneubildung (Muschler, Nakamoto, & Griffith, 2004) illustriert. Es kommt zum Einwachsen osteogener sowie endothelialer Zellen in die Poren des Materials.

Stammzellen und Osteoprogenitorzellen werden in Abbildung 3, Abbildung 4 und Abbildung 5 in grün dargestellt, sie wachsen adhärent und sind gleichmäßig über die Matrix verteilt, diese dient als Trägersystem für die anhaftenden Zellen. Auch andere nicht-osteogene Zellen (hier rot dargestellt) adhären auf der Matrixoberfläche. Die gezeigte Matrix besitzt Porengrößen von etwa $150\text{ }\mu\text{m}^2$ was, wie von Hulbert et al. (1970) und Klawitter et al. (1971) beschrieben, ein Einwachsen von Zellen mit anschließender Knochenbildung fördert.

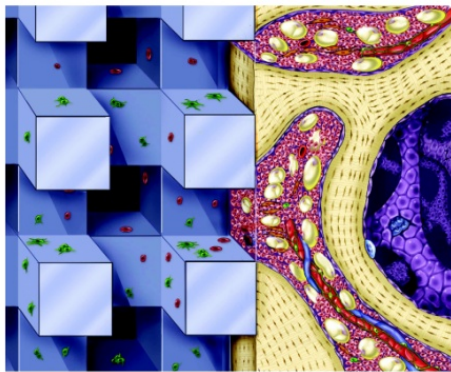


Abbildung 3: Frühstadium der Knochenbildung durch das Einwachsen von Zellen in ein Trägermaterial (aus Muschler et al., 2004).

Nach der Implantation des Materials sind die osteogenen Zellen an der Oberfläche des Trägers begünstigt, was Faktoren wie Sauerstoff/ Glukosekonzentration und andere Nährstoffe betrifft. Zellen, die tiefer im Träger eingebettet sind und weiter von vaskularisierendem Gewebe entfernt liegen, konkurrieren mit allen anderen Zellen im Trägerinneren, und haben daher eher einen Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen.

Milde bis mäßige hypoxische Milieubedingungen können ein Stimulus für diese Zellen sein zu proliferieren, zu migrieren sowie Zytokine zu sezernieren, welche andere Zellen stimulieren in das Trägermaterial einzuwandern.

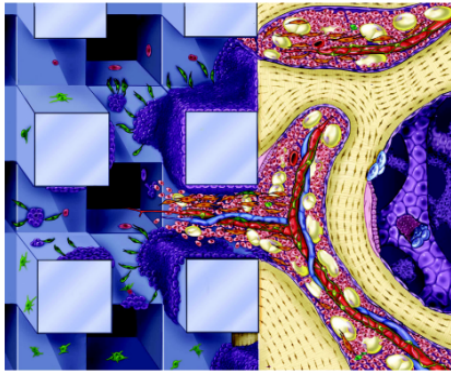


Abbildung 4: Zwischenstadium des Einwachsens von neugebildetem Knochen in ein Trägermaterial (aus Muschler et al., 2004).

Nach einigen Tagen wachsen weitere Zellen in das Trägermaterial ein, wie inflammatorische Zellen, zusätzliche Progenitorzellen die durch die Stammzellaktivierung angelockt wurden und auch endotheliale Zellen, die eine Vaskularisierung des Trägers initiieren. Alle genannten Zelltypen konkurrieren unmittelbar mit den Zellen im Trägerinneren. Die Auswahl von biokompatiblen Materialien reduziert den Wettbewerb um Sauerstoff und Nährstoffe durch zusätzlich angelockte inflammatorische Zellen. Die einwandernden, überlebenden Osteoprogenitorzellen und Stammzellen teilen sich, migrieren, differenzieren und bilden nach und nach ein ganzes Netzwerk aus Geflechtknochen am und im Trägermaterial.

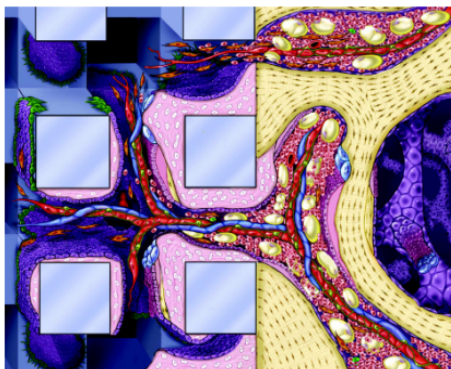


Abbildung 5: Endstadium des Einwachsens von neugebildetem Knochen in eine Trägermaterial (aus Muschler et al., 2004).

In der Folge kommt es zu einer Zunahme an neusynthetisiertem Knochengewebe im Trägermaterial und an den angrenzenden Bereichen des Implantats. Der zunächst gebildete weichere Geflechtknochen wird durch Lamellenknochen ersetzt, welcher zu einem verbundenen Netzwerk im Trägermaterial führt. Es kommt außerdem zur vaskulären Remodellierung. Weit innenliegende Bereiche des Trägers, die zunächst nicht durch Zellen besiedelt wurden, werden stufenweise durch migrierende Stamm- und Progenitorzellen erschlossen.

1.3.5 Vaskularisierung von Trägern

Angiogenese bezeichnet die Ausbildung von neuen Kapillaren und Blutgefäßen und ist ein streng regulierter Prozess (Folkman & D'Amore, 1996; Risau, 1997), der essentiell für die Skelettentwicklung und –reparatur ist (Folkman & Ingber, 1992), einschließlich des Knochengewebes selbst (Winet, 1996). Die wichtige Bedeutung der Vaskularisierung bei der Osteogenese ist schon seit 1763 bekannt (Haller, A., 1763): „der Ursprung des Knochens ist die Arterie, die das Blut und darin gelöst mineralische Elemente transportiere“. Kurze Zeit später entdeckte Hunter, dass die Blutgefäße einen entscheidenden Beitrag sowohl bei der Knochenentwicklung wie auch bei der Reparatur von Knochendefekten zum Prozess der Osteogenese beitragen (Hunter J., 1796). Die folgenden 150 Jahre wurde sehr wenig im Bereich der Vaskularisierung von Knochenbrüchen geforscht, der Fokus des Forschungsinteresses lag hauptsächlich bei den knochenaufbauenden Osteoblasten. Erst im Jahr 1963 nahm der Forscher J. Trueta dieses Thema erneut auf und veröffentlichte seine Thesen zur Vaskularisierung während der Osteogenese (Trueta & Buhr, 1963). Eine inadäquate oder unzureichende Vaskularisierung des Knochens

wird dabei assoziiert mit einer herabgesetzten Knochenneubildung und einer geringeren Knochenmasse (Glowacki, 1998). Dieser Fakt wird auch unterstützt durch Daten aus dem Tierversuch: Wird die Angiogenese während der Frakturheilung unterbrochen, erfolgt die Bildung von fibrösem Gewebe- wie sie typischerweise vorkommt bei ausbleibenden Frakturheilungen (Hausman, Schaffler, & Majeska, 2001). Die Hauptursachen für eine schlechte Knochenheilung sind eine unzureichende Blutzufuhr, eine schlechte Position der Frakturrenden zueinander, die Zwischenlagerung von Weichteilgewebe oder nekrotisches Knochengewebe zwischen Knochenfragmenten, eine ungenügende Ruhigstellung der Frakturrenden, eine Infektion, fortgeschrittenes Alter, systemische Erkrankungen (z.B. Diabetes) oder Drogenmissbrauch (Einhorn, 1995). Es ist deshalb von essentieller Bedeutung für eine Frakturheilung bei der synthetische Trägermaterialien eingesetzt werden, dass eine Einsprossung von Gefäßen und so eine gute Vaskularisierung möglich ist bzw. durch eine entsprechend hohe Porosität des verwendeten Materials gefördert wird.

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induziert die Expression von VEGF in Osteoblasten. VEGF, ein endothelialer zellspezifischer Angiogenese-Faktor ist bei der Knochenbildung und –Reparatur beteiligt (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003; Schlaeppli, Gutzwiller, Finkenzeller, & Fournier, 1997). Die verschiedenen Stadien der Knochenneubildung werden in Abbildung 6 dargestellt.

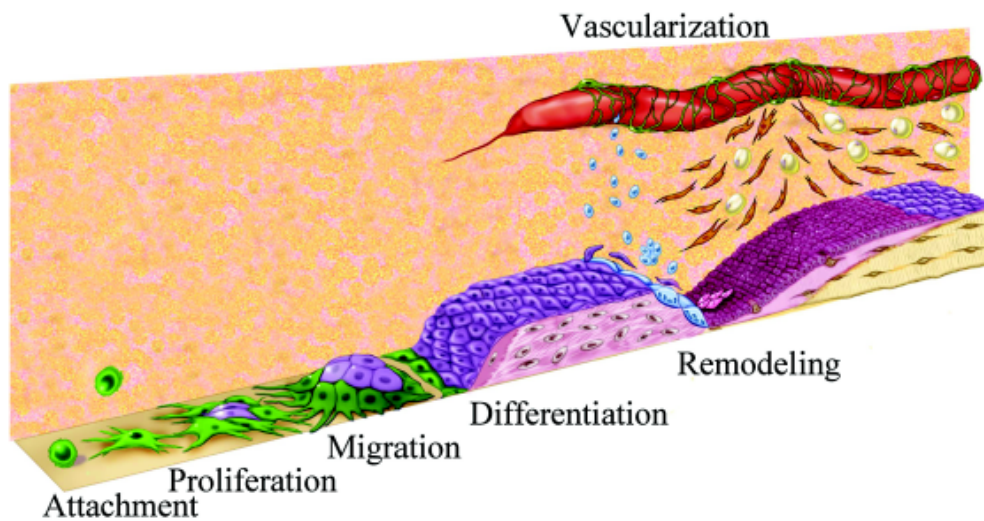


Abbildung 6: Veranschaulichung der verschiedenen Stadien der Knochenneubildung (aus Muschler et al., 2004).

Nach der Adhäsion und /oder der Aktivierung von Stammzellen (grün) findet ein kontinuierlicher Proliferations- und Migrationsprozess von Vorläuferzellen statt, welche Klone oder Kolonien an neuen Zellen hervorbringen. Das Differenzierungsstadium ist gekennzeichnet durch die Ausbildung einer entsprechenden Matrix, ausgehend vom Zentrum der Kolonie. Zunächst wird Geflechtknochen gebildet (desmale Ossifikation). Die Zellen können aber auch indirekt Geflechtknochen synthetisieren über die Umwandlung von Knorpelgewebe (endochondrale Ossifikation). Die Ausbildung von reifem Knochengewebe bleibt aus, wenn keine ausreichende neue bzw. existierende Blutzufuhr vorhanden ist. Der Remodelling-Prozess beinhaltet den Prozess der Osteoklasten- Knochenresorption, welcher durch die Rekrutierung und Aktivierung von zusätzlichen Stammzellen und Vorläuferzellen des Knochenmarks unterstützt wird (Muschler et al., 2004).

1.3.6 Humane mesenchymale Stammzellen/ Stromazellen

1.3.6.1 Definition „mesenchymale Stammzelle“

Der Begriff der humanen mesenchymalen Stammzelle wurde 1991 erstmals von Caplan geprägt (Caplan, 1991). Er beschreibt diesen Zelltyp als Vorläuferzellen, die die Fähigkeit besitzen sich zu teilen und in verschiedene Gewebetypen zu differenzieren (z.B. zu Knorpel- oder Knochengewebe). Sie dienen zeitlebens der Regeneration mesenchymaler Gewebe wie zum Beispiel Knochen-, Knorpel-, Muskel oder Fettgewebe. Bei dem Begriff der mesenchymale Stammzellen oder auch „Marrow stromal cells“ (im weiteren MSC), handelt es sich um eine Zellpopulation, die ursprünglich aus dem Mesoderm stammt. Die Isolierung dieser Zellpopulation erfolgt über ihre Eigenschaft an Polystyrol/polystyrene Oberflächen zu adhären (Haynesworth et al., 1992). MSCs wurden ursprünglich auch als Fibroblasten-Kolonie bildende Zellen (fibroblastoid colony-forming-cells) bezeichnet da eine weitere charakteristische Eigenschaft dieser Zellen die Kolonie-Bildung bei geringer Aussaatdichte ist (Friedenstein, Chailakhyan, Latsinik, Panasyuk, & Keiliss-Borok, 1974). Die Effizienz mit der MSC Kolonien ausbilden ist dabei entscheidend für die proliferative Qualität der jeweiligen MSC-Zellpräparation (Pochampally, 2008).

1.3.6.2 Herkunft und Differenzierbarkeit von MSC

MSC können aus unterschiedlichen Geweben isoliert werden wie etwa aus Fettgewebe (Kern, Eichler, Stoeve, Kluter, & Bieback, 2006; Zuk et al., 2001), Knochenmark (Pittenger et al., 1999), Periost (Nakahara, Goldberg, & Caplan, 1991),

Muskel (Bosch et al., 2000; Williams, Southerland, Souza, Calcutt, & Cartledge, 1999), Dermis (Young et al., 2001) und Nabelschnurblut (Erices, Conget, & Minguell, 2000). *In vitro* kann dieser Zelltyp in ausreichender Menge expandiert und ohne Immunsuppression zurückgegeben werden. Deshalb eignen sich MSC besonders für die Verwendung im Bereich des Tissue Engineerings (Bruder, Fink, & Caplan, 1994; de Wynter, Emmerson, & Testa, 1999; Griffin, Iqbal, & Bayat, 2011; Verfaillie, Schwartz, Reyes, & Jiang, 2003). Neben der symmetrischen Zellteilung, bei der aus einer Mutterzelle zwei gleichrangige undifferenzierte Tochterzellen entstehen (Morrison & Kimble, 2006) besitzen MSC die Eigenschaft zur asymmetrischen Teilung: hierbei entsteht neben einer Vorläuferzelle (die einen festgelegten Differenzierungsprozess durchläuft) eine identische Tochterzelle (Hall & Watt, 1989; Knoblich, 2008).

MSC können dabei zu verschiedenen Zelltypen des Mesoderms differenzieren z.B. zu Fett-, Knochen-, Knorpelzellen (Friedenstein, Gorskaja, & Kulagina, 1976) oder Kardiomyozyten (Yuan et al., 2005). Einige Publikationen beschreiben jedoch auch, dass MSC die Keimblattspezialisierung ablegen um in Zelltypen des Ektoderms oder anderer Keimblätter direkt oder indirekt über andere Stammzellstadien differenzieren können (sog. Transdifferenzierung) z.B. zu neuronalen Zellen, Hepatozyten oder pulmonalen Zellen (Friedenstein et al., 1976; Jiao et al., 2012; Kuroda & Dezawa, 2014). Als Vorläuferzellen befinden sich die MSC in einem inaktiven Zustand (im Zellzyklusarrest) bis eine Versorgung an spezifischen differenzierten Zellen erforderlich wird woraufhin ihre Zellteilung beginnt.

1.3.6.3 Charakterisierung von MSC, Oberflächenmarker

In der Literatur sind zahlreiche der Charakterisierung von MSC dienende Oberflächenmoleküle (cluster of differentiation) beschrieben (Bianco, Robey, & Simmons, 2008; Rasini et al., 2013). Im Jahr 2006 einigte sich daher das “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” auf Minimalkriterien um diesen speziellen Stammzelltyp zu beschreiben (Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005).

Tabelle 1: Minimalkriterien für MSC -verändert nach (Dominici et al., 2006).

Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen	
Phänotyp:	<p>Positiv ($\geq 95\%$ +): CD105, CD73, CD90</p> <p>Negativ ($\leq 2\%$ +): CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19, HLA-DR</p>
<i>In vitro</i> Differenzierbarkeit: Osteoblasten, Adipozyten, Chondroblasten (Nachweis durch entsprechende Färbung der <i>in vitro</i> Zellkulturen).	

1.3.6.4 Hämatopoetische Nische

Das Knochenmark setzt sich hauptsächlich aus drei Zelltypen zusammen: den Hämatopoetischen Stammzellen und deren Abkömmlinge, Stromazellen wie z.B. Fibroblasten, Osteozyten und endothelialen Zellen. Die mesenchymale Stammzellen machen neben den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) die zweitgrößte Stammzellfraktion im Knochenmark aus (Verfaillie et al., 2005) obwohl ihr Vorkommen gering ist: von 100 000 mononukleären Zellen des Knochenmarks handelt es sich nur bei etwa jeder fünften Zelle um eine MSC (Livingston et al. 2001, Jaiswal et al., 1997). Mesenchymale Stammzellen sezernieren Wachstumsfaktoren

für Hämatopoetische Stammzellen (Li & Wu, 2011) und sind so auch indirekt an der Hämatopoese (Haynesworth, Baber, & Caplan, 1996) beteiligt.

1.3.6.5 Einsatz von MSC bei der Knochenheilung: Studien

Der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen bei der Regeneration von Knochendefekten wurde in zahlreichen Studien beschrieben (Livingston et al., 2003; Pountos, Georgouli, Kontakis, & Giannoudis, 2010). Für Knochenheilungsstudien werden meist adulte mesenchymale Stammzellen eingesetzt. Der große Vorteil dieser Zellpopulation gegenüber den embryonalen Stammzellen ist die ethische Unbedenklichkeit und die leichtere Verfügbarkeit (Lako, Trounson, & Daher, 2011; Zhai & Qiu, 2013).

Die Zellen werden dabei auf ein Knochenersatzmaterial der sog. Leitschiene aufgebracht und dem Spenderorganismus in den zu deckenden Defekt eingepflanzt. Es wurden bereits zahlreiche Knochenersatzmaterialien experimentell (im Maus-, Ratten-, Kaninchen- oder Hundemodell bzw. im Menschen) getestet wie z.B. Hydroxylapatit- oder Trikalziumphosphatkeramiken oder Kollagen-basierte Trägermaterialien mit positiven Ergebnissen zur Knochenneubildung (Arinzeh et al., 2003; Bruder et al., 1998; Cowan et al., 2004; De Kok, Drapeau, Young, & Cooper, 2005; Gan et al., 2008; Kawate et al., 2006; Lin et al., 2007; Lyons et al., 2010; Matsushima et al., 2009; Morishita et al., 2006; Shors, 1999; Uchida et al., 1984; Wilkins, Chimenti, & Rifkin, 2003; Yamasaki, Yasunaga, Ishikawa, Hamaki, & Ochi, 2010; Yuan, Cui, Zhang, Liu, & Cao, 2007). Auch Experimente mit korralinem Knochenersatzmaterial (Bensaid et al., 2005; Petite H., 2000; Viateau et al., 2007), Kalzium-Alginat-Konstrukten (Shang et al., 2001) oder Hydroxylapatit/ Silikon-

stabilisierte Trikalziumphosphat-Konstrukten (Giannoni et al., 2008; Kon et al., 2000; Mastrogiacomo et al., 2005) zeigen, dass es in Kombination mit MSC oft erfolgreich zu einer Frakturheilung kommt, während in Abwesenheit der Stammzellen eine Knochenheilung meist ausbleibt.

1.3.6.6 Immunmodulation durch MSC

Mesenchymale Stammzellen besitzen stark immunmodulatorische Eigenschaften (Aggarwal & Pittenger, 2005), weswegen sie bei der allogenen Stammzelltransplantation zur Reduktion bzw. Therapie von Abstossungsreaktionen eingesetzt werden (English & Wood, 2013; Le Blanc, Tammik, Rosendahl, Zetterberg, & Ringden, 2003). Mesenchymale Stamzellen können die Proliferation von T-Lymphozyten durch die Sekretion von Stickstoffmonoxid und Prostaglandin E2 inhibieren. Sie sind aber auch in der Lage die Proliferation von B-Zellen zu unterdrücken (Beckmann et al., 2014). MSCs im Frakturspalt bewirken eine reduzierte Sekretion von Entzündungsmediatoren wie TNF-alpha und Interferon-gamma, was zu einer Inhibierung von dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen führt (Iyer & Rojas, 2008).

1.3.6.7 Osteogene Differenzierung von MSC

In vitro kultivierte mesenchymale Stammzellen verändern bei Zusatz von β -Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure ihre Morphologie (von fibroblastenartiger Form hin zu einem kuboiden/kuboidalen Typus) und beginnen mit der Produktion von extrazellulärem mineralisierten Hydroxylapatit, einer charakteristischen Eigenschaft von Osteoblasten und Osteozyten (Beresford, Joyner, Devlin, & Triffitt, 1994; Rickard et al., 1996). Dexamethason, ein Glukokortikoid, ist dabei die für den osteogenen Differenzierungsprozess entscheidende Komponente. (Porter, Huckle, & Goldstein, 2003). Ascorbinsäure ist nicht erforderlich für den Differenzierungsprozess selbst, die Zugabe ins Medium während des Differenzierungsprozesses führt aber zu einer deutlich stärkeren Bildung von kollagenreicher, extrazellulärer Matrix (Choi et al., 2008). Der Zusatz von β -Glycerolphosphat zum Differenzierungsmedium sorgt für günstige Bedingungen während der Mineralisierung (Coelho & Fernandes, 2000). Durch die Zugabe dieser Stoffe findet so stufenweise eine Differenzierung der MSC zu Osteoprogenitorzellen über Prä-Osteoblasten zu Osteoblasten statt. Osteoblasten werden dabei in die verkalkende extrazelluläre Matrix eingebettet (Osteoid). Am Ende dieser Differenzierungskaskade stehen die Osteozyten, diese sind nicht mehr teilungsfähig und regulieren *in vivo* die Kalzium- bzw. Phosphathomöostase der Knochen (Kalfas, 2001) und steuern die Aktivität der Knochen um- bzw. abbauenden Osteoklasten.

1.3.6.8 Ovine MSC: Charakterisierung

Für den tierexperimentellen Teil dieser Arbeit wurden Stammzellen aus dem Knochenmark von Schafen isoliert (ovine MSC). Da für ovine MSC in der Literatur nur sehr wenige getestete FACS-Oberflächenmarker existieren, wurde für das Nicht-Humane Modell auf funktionelle Parameter ausgewichen. Die MSC-Identität der isolierten Zellen wurde durch Differenzierungsexperimente bestätigt. Jedes Knochenmark-Isolat wurde adipogen, osteogen und chondrogen differenziert und nach entsprechender Anfärbung fotografisch dokumentiert und die Anzahl positiver d.h. differenzierter Zellen abgeschätzt. Außerdem wurden CFU-F Experimente durchgeführt. Mesenchymale Stammzellen haben eine wichtige Bedeutung beim Tissue Engineering mit synthetischen Knochenersatzmaterialien (wie in Kapitel 1.3.4 bis 1.3.6 beschrieben). In der vorliegenden Arbeit sollte die Etablierung eines „Defekts kritischer Größe beim Schaf“ ähnlich wie bei Petite et al. beschrieben erfolgen (Petite H., 2000). Ein Defekt dieser Größe kann per Definition nicht von alleine überbrückt werden (Hollinger et al., 1998), wenn er nicht mit einem Knochenersatzmaterial gefüllt wird. Für eine vollständige knöcherne Durchbauung des Defekts musste eine Distanz von etwa 1,5 cm überbrückt werden. Defektgrößen mit ähnlichen Abmessungen (zwischen 20 und 25 mm), wurden bereits erfolgreich im Schaf überbrückt (Shang et al., 2001; Viateau et al., 2007).

1.3.7 Endothelzellen

Endotheliale Vorläuferzellen (EPC) sind essentiell für den Prozess der Gefäßneubildung (Angiogenese) z.B. bei der Regeneration von verletztem Gewebe und Organen (Folkman & D'Amore, 1996). Die mangelhafte Blutversorgung von Geweben und Organen führt zu einer Hochregulierung von angiogenetischen Faktoren wie Vascular endothelial growth factor (VEGF), Stromal cell-derived Factor-1 (SDF-1), Insulin-like growth Factor-1 (IGF-1) und Hepatocyte growth Factor (HGF). Diese Wachstumsfaktoren werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert (auch EPCs) und fördern die Migration zum Ort der Verletzung (Asahara et al., 1997; Urbich et al., 2005). Die EPCs werden in neugebildete Kapillaren eingebunden und können durch parakrine Faktoren wie Zytokine die Neovaskularisierung fördern. Die Zytokine unterstützen die örtliche Angiogenese und ansässige Gewebeprevorläuferzellen werden mobilisiert (Urbich et al., 2005).

1.3.7.1 Kombination endothelialer Zellen mit humanen MSC zur Förderung der Knochenheilung

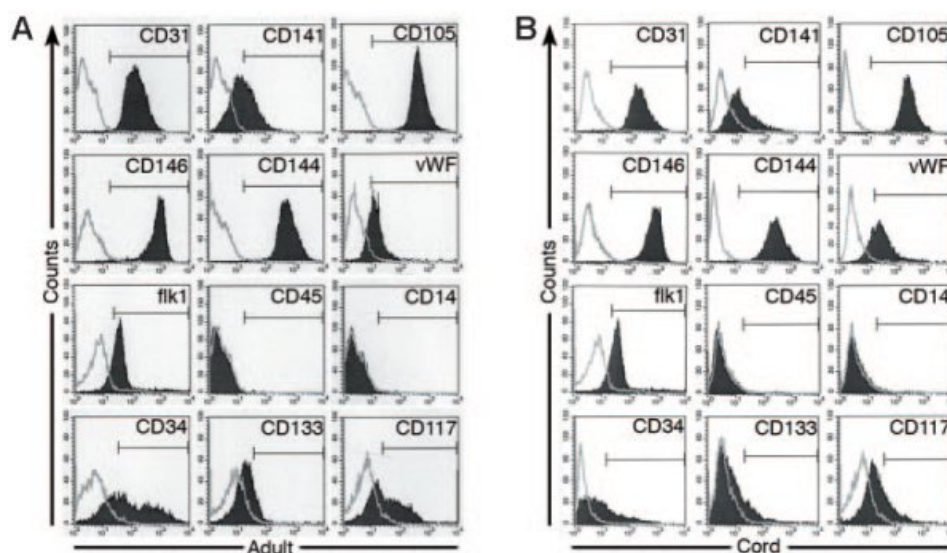
Um die Knochenheilung zusätzlich zur Gabe von spendereigenen, isolierter MSC auf das Knochenersatzmaterial weiter zu verbessern, wurden aus Leukaphereseprodukten (Kegeln bzw. Beuteln) endotheliale Vorläuferzellen isoliert. Nach einer umfassenden Charakterisierung der Isolate (FACS-Analyse der Endothelzellmarker, Aufnahme von Dil-Ac-LDL sowie Bestimmung des *in vitro* Angiogenesepotentials) wurden zunächst mehrere Medien auf ihre Eignung überprüft, eine Co-Kultur von MSC und ECFC zu ermöglichen. Da in der Literatur

positive Wechselwirkungen von MSC und ECFCs – sowohl bei direktem Zell-Zell-Kontakt wie auch durch parakrine Faktoren- beschrieben werden (Aguirre, Planell, & Engel, 2010; Kolbe et al., 2011; Liu et al., 2012) sollte in weiteren Experimenten die Wechselwirkungen von ECFC und MSC v.a. bei der Kapillarbildungsfähigkeit von ECFC sowie der osteogenen Differenzierung von MSC untersucht werden.

1.3.8 Charakterisierung: Marker, Kriterien

Um die ECFC-Identität der isolierten Zellen zu bestätigen wurde bei allen Zellen gemäß den Anforderungen, die in der Literatur beschrieben werden (Ingram et al., 2004; Yoder et al., 2007), die An- bzw. Abwesenheit folgender Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht: CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD105, CD117, CD133, CD144, CD146 und VEGF-R2.

Tabelle 2: FACS-Panel von adulten Endothelzellen vs. endothelialen Vorläuferzellen (aus Ingram et al). A: Übersicht der Oberflächenmarker von adulten Endothelzellen vs. B: von endothelialen Vorläuferzellen.



ECFCs exprimieren CD31, CD105, CD146 und CD144, sie sind jedoch negativ für CD45 und CD14 (Ingram et al., 2004; Yoder et al., 2007). Einige von ihnen exprimieren z.T. CD34, CD133 sowie CD117 .

Tabelle 3: Vergleich der Oberflächenmarker von CFU-ECs und ECFCs aus (Yoder et al., 2007).

Antigen	CFU-ECs	ECFCs
CD31	92.31 ± 5.47	92.29 ± 1.32
CD105	74.36 ± 6.32*	96.73 ± 1.79
CD144	34.80 ± 8.74*	99.15 ± 0.85
CD146	56.52 ± 10.00†	94.21 ± 3.71
KDR	99.19 ± 0.81	68.61 ± 11.26
VWF	67.21 ± 12.78	97.09 ± 2.05
UEA-I	41.80 ± 11.67*	100
Ac-LDL	73.68 ± 9.05*	99.75 ± 0.25
CD14	98.53 ± 1.04‡	1.20 ± 0.74
CD45	98.15 ± 1.85‡	0.37 ± 0.37
CD115	94.42 ± 2.52‡	0.28 ± 0.21

Results represent the mean percentage of cells expressing surface antigens or taking up Ac-LDL ± SEM from 5 independent experiments with cells derived from different donors.

* $P < .01$ by unpaired Student *t* test, CFU-ECs versus ECFCs.

† $P < .02$ by unpaired Student *t* test, CFU-ECs versus ECFCs.

‡ $P < .001$ by unpaired Student *t* test, CFU-ECs versus ECFCs.

Um zeigen zu können, dass es sich bei dem hier isolierten Zelltyp nicht um die „reifere Form“ der Endothelzellen handelt (CFU-ECs) sondern um den Vorläuferzelltyp ECFC (höheres proliferatives Potential, Gefäßbildung *in vivo*) werden die Oberflächenmarker der isolierten Zellen v.a. auf die Expression von CD 14 und CD 45 analysiert. Hier zeigen die ECFCs nahezu keine Expression (siehe Tabelle 3) während diese Oberflächenmarker bei den CFU-ECs sehr hoch exprimiert werden.

Im Weiteren wird untersucht ob der isolierte Zelltyp fähig ist in einem *in-vitro* tube formation-Test kapillarähnliche Strukturen auszubilden bzw. LDL aufzunehmen (Dil-Ac-LDL uptake).

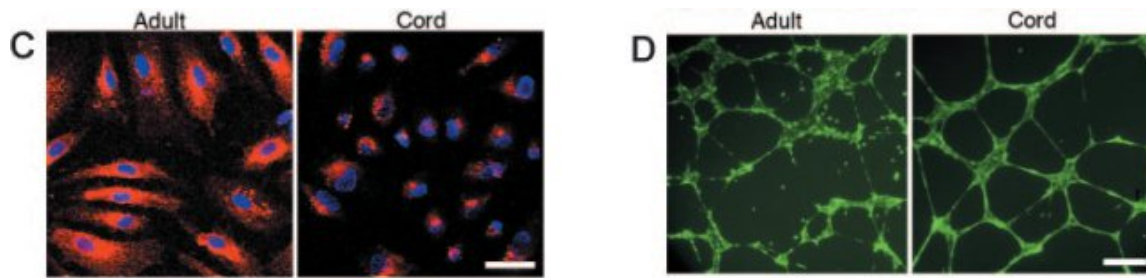


Abbildung 7: Vergleich adulter Endothelzellen vs. endothelialen Vorläuferzellen bei C: AC-LDL-uptake (rot) , DAPI (blau) Aufnahme bei 50-facher Vergrößerung und D: Tube formation Bildung auf Matrigeloberfläche, Färbung der Zellen mit eGFP , Aufnahme bei 50-facher Vergrößerung (Quelle: Ingram et al).

Während CFU-ECs keine Kapillarbildung *in vivo* zeigen, besitzen ECFCs diese Eigenschaft. Die Aufnahme von LDL kann bei beiden Zelltypen erfolgen, auch wenn die Aufnahme bei den ECFCs mit etwa 99,7% (siehe Tabelle 3) deutlich höher liegt wie bei den CFU-ECs (73,7%). Die Aufnahme des acetylierten Low Density Lipoproteins (Dil-Ac-LDL) erfolgt durch den Scavenger Rezeptor I. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um ein 115 kDa glykosyliertes Transmembranprotein, welches neben der Expression auf Endothelzellen auch bei Monozyten, Makrophagen, Perizyten und Fibroblasten nachgewiesen wird (Goldstein, Ho, Basu, & Brown, 1979; Voyta, Via, Butterfield, & Zetter, 1984). LDL dient als Transportprotein für Cholesterin. Die Aufnahme von fluoreszenz- markiertem Dil-Ac-LDL ist ein wichtiges Kriterium um isolierte Zellen als ECFC zu charakterisieren (Voyta et al., 1984).

Material und Methoden

1.4 Zellkultur

Alle zellkulturellen Arbeiten wurden generell, soweit nicht anders vermerkt unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe, Heraeus Instruments) durchgeführt. Sämtliche verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch 25 min bei 121°C und einem bar Überdruck autoklaviert (Autoklav KSG 119, KSG Sterilisatoren GmbH) oder alternativ mittels Spritzenfiltern (Syringe-Filter Minisart 0,2 µm Porengröße, Sartorius) steril filtriert.

1.5 Isolation von BM-MSC:

Dichtegradientenzentrifugation vs. Direktaussaat

Das Knochenmark wurde von Patienten ohne metabolische oder neoplastische Krankheiten- nach vorheriger schriftlicher Einwilligung- unter sterilen Bedingungen während orthopädischer Operationen entnommen (Orthopädie Tübingen, AG Prof. Dr. med. T. Kluba). Das aspirierte Knochenmarksvolumen variierte zwischen 3,5 ml und 50 ml. Als Antikoagulanzen wurde Heparin (5000 IE) gewählt. Die Isolation erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll nach Kern et al. (Kern et al., 2006). Das heparinisierte Knochenmarksaspirat wurde zunächst gefiltert (steriler 100 µm-Zellsieb, BD-Falcon) um größere Knochenstücke und Koagel abzutrennen. Danach erfolgte ein Verdünnungsschritt mit PBS-Lösung (1:2 Verdünnung), die verdünnte Knochenmarkssuspension wurde dann vorsichtig auf einen Dichtegradienten

geschichtet (Lymphoflot, Dichte 1,077- 1,080 g/ml, BioRad). Die mononukleäre Zellfraktion wurde anschließend durch eine 20- minütige Dichtegradientenzentrifugation bei 1000- facher Erdbeschleunigung als sichtbarer Ring in der Interphase angereichert. Nach der Abnahme dieser Zellfraktion erfolgen mehrere Waschschrte mit PBS-Lösung und anschließender Zellzahlbestimmung (CellDynRuby System, Fa. Abbott). Die Aussaat der Zellen erfolgte in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/cm² in Kulturmedium. Im Falle der Direktaussaat wurde die Zellzahl des heparinisierten Knochenmarksaspirats ermittelt und dann direkt -ebenfalls mit einer primären Aussaatsdichte von 1×10^5 Zellen/cm²- in Kulturmedium ausgesät. 24 Stunden nach der Primäraussaat wurde bei beiden Isolierungsvarianten ein erster Medienwechsel mit vorgewärmtem Kulturmedium durchgeführt um nicht-adhärenente Zellen aus der Kultur zu entfernen.

Um die Stammzellidentität der Zellen zu bestätigen wurde bei allen verwendeten Zellen gemäß den Minimalkriterien des „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy“ auf die An- bzw. Abwesenheit von insgesamt 41 Oberflächenmarker (siehe Anhang Tabelle 47) durchflusszytometrisch untersucht.

Desweiteren wurden bei allen humanen MSC jeweils in der 1. Passage folgende Differenzierungen (adipogen, osteogen, chondrogen und CFU-F) angesetzt und nach der entsprechenden Anfärbung (siehe Tabelle 4) qualitativ beurteilt.

1.5.1 Färbungen

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Differenzierungen, die bei den isolierten MSC stets in der ersten Zellpassage durchgeführt wurden um die Stammzellidentität zu bestätigen und zu charakterisieren. Des Weiteren gibt Tabelle 4 einen Überblick über die angewandten Färbemethoden die unter 1.5.1.1 bis 1.5.1.4 genau beschrieben werden.

Tabelle 4: Differenzierungen hMSC (Passage 1) und jeweilige Färbemethode/n

Adipogene Differenzierung	Ölrotfärbung
Chondrogene Differenzierung	Alzianblaufärbung
	SafraninO-Färbung
Osteogene Differenzierung	Alizarinrot Färbung

1.5.1.1 Alizarinrotfärbung

Der Alizarin Red S- Farbstoff (Sigma Aldrich) wurde in Aqua Dest. gelöst (Endkonzentration 40 mM). Anschließend wurde die Farbstofflösung mit HCl auf pH= 4,1 eingestellt. Die unverdünnte Farbstofflösung wurde nach der entsprechenden Differenzierungszeit auf die zuvor gewaschenen und fixierten Zellen (10% Formalin) gegeben und bei Raumtemperatur 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde vier Mal mit Aqua Dest. gewaschen (4 ml pro Well). Die extrazelluläre Knochenmatrix wurde rot angefärbt. Die Proben wurden mikroskopisch beurteilt und auf ihre %-uale Positivität geschätzt.

1.5.1.2 Ölrotfärbung

Der Ölrotfarbstoff (Oil Red O Pulver, Sigma) wurde in 99%-igem Isopropanol gelöst. Die Farbstoffstocklösung wurde für die Färbung stets verdünnt angewendet (3 Teile Ölrotfarblösung auf 2 Teile Aqua Dest.) und vor der Verwendung gefiltert (Macherey-Nagel, Art.Nr. 0254606505). Auf die gewaschenen und fixierten Zellen (10% Formalin) wurde pro 25 cm² Kulturflasche 3 ml der filtrierten Färbelösung gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde so lange mit Leitungswasser gespült, bis das Wasser klar blieb. Dann wurde 2 ml Hematoxylin-Lösung (gebrauchsfertig, Sigma Cat No. HHS-16) in die Kulturflasche gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Hematoxylinlösung entfernt und wieder mit Leitungswasser gespült. Im Anschluss erfolgte die mikroskopische Beurteilung auf die %-uale Positivität der Proben.

1.5.1.3 Safranin O-Färbung

Die Herstellung der Safranin O-Färbelösung erfolgte in Aqua Dest. (Endkonzentration 0,1%). Nach der Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen gewaschen und mit Citrat-Lösung fixiert (Sigma, Cat.Nr. 91-5, 27 mM, pH=3,6). Danach wurde dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend 1%-ige Essigsäure für ca. 10 Sekunden zu den Zellen gegeben. Im Anschluss wurde mit 0,1%-igen Safranin O-Farbstofflösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS-Lösung und direkt folgend das Schneiden des Zellpellets bzw. die mikroskopische Beurteilung der Proben. Bei der

Safranin O-Färbung werden die beiden Matrixbestandteile Glykosaminoglykane und Proteoglykane angefärbt, die während der Chondrogenese gebildet werden.

1.5.1.4 Alzianblaufärbung

Die Alzianblaufärbelösung wurde in 3%-iger Essigsäure angesetzt (Endkonzentration 1%). Die Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums zweimal mit PBS-Lösung gewaschen und im Anschluss in 70%-igem Ethanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde erneut zweimal mit PBS-Lösung gewaschen und dann die Alzianblau-Färbelösung für 30 Minuten auf das Zellpellet gegeben. Im Anschluss wurde mit Aqua Dest. gewaschen bis die Waschlösung klar blieb. Danach erfolgte das Schneiden des Pellets bzw. die mikroskopische Beurteilung der Proben. Der Alzianblau-Farbstoff färbt die bei der chondrogenen Differenzierung produzierten Matrixbestandteile (Proteoglykane) türkis an.

1.6 Isolation von EPC aus Vollblut, Leukaphereseprodukten und Leukozytendepletionskegeln

Für die Isolierung endothelialer Vorläuferzellen aus Vollblut bzw. aus Leukaphereseprodukten wurde ein spezielles Isolierungsmedium auf Basis des EBM-2 Basalmediums + EGM-2 Single Quots (Art. CC-3156; Fa. Lonza) verwendet. Dieses unterscheidet sich vom später verwendeten Kulturmedium ausschließlich in der Konzentration an eingesetztem Heparin. In Tabelle 5 werden alle Bestandteile des Isolierungsmediums aufgeführt.

Tabelle 5: Isolierungsmedium für Endotheliale Progenitorzellen.

EBM-2 Basalmedium (CC-3156, Fa.Lonza)
EGM-2 Single Quots:
Hydrocortisone
hFGF-B
VEGF
IGF-1
Ascorbinsäure
HEGF
GA-1000
Heparin
1% Pen/Strep
10% HPL (wird immer frisch zugegeben)
10 I.E. Heparin pro ml Medium (zusätzlich zum im Kit enthaltenen Heparin)

1.6.1 Isolierung aus Vollblut

Für die Isolierung von endothelialen Vorläuferzellen (EPC) aus Vollblut wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll von Hofmann et al. verwendet (Hofmann, Reinisch, & Strunk, 2009). Das heparinisierte Vollblut (16 I.E./ml) wurde 1: 5 mit Kulturmedium für EPCs (Fa. Lonza) + 10 I.E. Heparin pro ml Medium verdünnt und innerhalb von 2 Stunden verarbeitet. Nach 24 Stunden wurde fünfmal mit temperierter PBS-Lösung gewaschen, danach erfolgte ein erster Medienwechsel. Nach maximal 3-4 Wochen kann ein kopfsteinpflasterartiges Wachstum der Zellen beobachtet werden (Medienwechsel 2 x wöchentlich mit vorgewärmtem EGM-2 Kulturmedium). Bei Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz erfolgte ein Ablösen der Zellen mit Trypsinlösung (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L Versene®) und eine Neuaussaat (1000 Zellen/cm²) in EGM-2 Kulturmedium.

1.6.2 Isolierung aus Leukozytendepletionskegeln

Die Leukozytendepletion wurde in den letzten Jahren als eine Methode zur Verbesserung der Qualität von Transfusionen (rote Blutkörperchen und Blutplättchen) kontinuierlich weiterentwickelt (Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe). Durch die Depletion der Leukozytenfraktion können unerwünschte Nebenwirkungen wie z.B. Immunreaktionen oder die Übertragung von Krankheitserregern reduziert werden. Die Depletion erfolgt über spezielle Filter (TrimaAccel von TerumoBCT). Die abgetrennten weißen Blutzellen (im weiteren WBC) verbleiben in der kegelförmigen Filtervorrichtung. Der Kegelinhalt wurde für die Isolierung der endothelialen Zellfraktion verwendet. Nach der Desinfektion des

Kegels wurde dessen Inhalt in einem 50 ml Falcon-Tube gesammelt. Der Kegelinhalt wurde dann 1:10 mit PBS verdünnt und zur Ermittlung der WBC-Zellzahl wird eine Probe am CellDynRuby System (Fa. Abbott) gemessen. Die Aussaat erfolgte mit einer WBC-Zelldichte von 5×10^6 Zellen/cm². Nach 24 Stunden wurde ein erster Medienwechsel durchgeführt, anschließend immer 2-mal pro Woche mit EGM-2 Kulturmedium.

1.6.3 Isolierung aus Leukapheresebeuteln

Zunächst wurde das Leukapheresepräparat 1:3 mit PBS + 20 I.E./ml Heparin verdünnt. Die verdünnte Zellsuspension wurde dann auf 50 ml Falcon-Tubes aufgeteilt und anschließend abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT), der Überstand dekantiert und das Zellpellet vorsichtig in 25 ml Isolierungsmedium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl (CellDynRuby System, Fa. Abbott) wurde nochmals 1:20 mit Isolierungsmedium verdünnt. Die Aussaat erfolgte mit einer WBC- Zelldichte von 5×10^6 Zellen/cm². Nach 24 Stunden wurde ein erster Medienwechsel durchgeführt, anschließend immer 2-mal pro Woche mit EGM-2 Kulturmedium.

Die Leukapherese-Isolate wurden mit Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC: human umbilical vein endothelial cells, Fa. PromoCell, Katalog Nr. C-12250) sowie aortalen, endothelialen Zellen (hAoEC: human aortic endothelial cells; Fa. PromoCell, Katalog Nr. C-12271) verglichen.

1.7 Verwendung von SAOS-2 Zellen

Bei den SAOS-2 Zellen handelt es sich um eine humane, etablierte Osteosarkoma Zell-Linie die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Osteoblasten für *in vitro* Mineralisierungsexperimente u.a. für die Testung verschiedener Knochenersatzmaterialien eingesetzt werden (Mayr-Wohlfart, Fiedler, Gunther, Puhl, & Kessler, 2001; Rodan et al., 1987; Schroder et al., 2005; Wiens et al., 2010). Sie bilden im Gegensatz zu anderen Sarkomzellen auch keine Tumore, wenn sie in Nude-Mäuse injiziert werden (Rodan et al., 1987). SAOS-2 Zellen zeigen *in vitro* eine sehr große Analogie zu reifen Osteoblasten und exprimieren viele osteoblastäre Marker wie Osteocalcin, Bone Sialoprotein oder Prokollagen-1 (Pautke et al., 2004). Die Kultivierung der SAOS-2 Zellen erfolgte wie von der Bezugsquelle (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) empfohlen in McCoy's 5A modified Medium mit 10% FCS-Zusatz.

1.8 Expansion hMSC in verschiedenen GMP-grade Medien

Um Knochenersatzmaterialien mit Spender-MSC besiedeln zu können, welche zu einem späteren Zeitpunkt wieder in einen Patienten eingesetzt werden sollen, ist es zwingend erforderlich die Zellen unter GMP- Bedingungen zu kultivieren. Dies beinhaltet unter anderem die Verwendung von Tierserum-freien Kulturmedien. Hierfür wurde eine Reihe verschiedener Medien auf deren Eignung für die Kultivierung und Differenzierung von humanen Stammzellen getestet.

Tabelle 6: Übersicht der getesteten, tierserumfreien Zellkulturmedien.

Grundmedium (Fa. Lonza)	Serumzusatz	Serum-konzentration	Sonstige Zusätze
Alpha MEM-Medium (1g/L Glucose)	humanes A-Serum	10%	1% P/S
Alpha MEM-Medium (1g/L Glucose)	humanes AB-Serum	10%	1% P/S
Alpha MEM-Medium (1g/L Glucose)	humanes Thrombozytenlysatz	5%	1% P/S +5 g/L humane Albuminlösung (EK)
Alpha MEM-Medium (1g/L Glucose)	humanes Thrombozytenlysatz	2%	1% P/S +5 g/L humane Albuminlösung (EK)
Alpha MEM-Medium (1g/L Glucose)	humanes Thrombozytenlysatz	5%	1% P/S +10 g/L humane Albuminlösung (EK)
Alpha MEM-Medium (1g/L Glucose)	humanes Thrombozytenlysatz	2%	1% P/S +10 g/L humane Albuminlösung (EK)

1.9 Expansion von EPC

Bis zum ersten Passagieren der isolierten Endothelzellen (siehe Abschnitt 1.12) wurden die Zellen in Isolierungsmedium kultiviert. Ab der 1. Passage erfolgte dann die Expansion der Endothelzellen in Kulturmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung des Kulturmedium für ECFCs.

EBM-2 Basalmedium (CC-3156, Fa.Lonza)
EGM-2 Single Quots:
Hydrocortisone
hFGF-B
VEGF
R3-IGF-1
Ascorbinsäure
HEGF
GA-1000
Heparin
1% Pen/Strep
10% Humanes Plättchenlysatz (wurde immer frisch zugegeben)

1.10 Expansion von Co-Kulturen von hMSC und EPC-Zellen

Um eine Co-Kultur von MSC und ECFC-Zellen etablieren zu können wurden zunächst verschiedene Medien (siehe Tabelle 8) auf ihre Eignung getestet.

Tabelle 8: Verschiedene Kulturmedien für die Kultivierung von Co-Kulturen (MSC/EPC).

Grundmedium	Serumzusatz	Serum-konzentration	Sonstige Zusätze
Alpha MEM-Medium (1g/L Glucose)	humanes AB-Serum	10%	30 µg/ml ECGS
Alpha MEM-Medium (1g/L Glucose)	humanes Thrombozytenlysat	5%	30 µg/ml ECGS, 50 µg/ml Heparin
EGM-2 Medium	FCS	10%	
EGM-2 Medium	humanes Thrombozytenlysat	5%	
EGM-2 Medium	humanes AB-Serum	10%	
EGM-2 Medium	humanes Thrombozytenlysat	10%	

Das FCS-haltige Medium wurde als Referenzmedium getestet, da es nicht GMP-kompatibel ist wurde es nur zu Vergleichszwecken verwendet.

1.11 Expansion hMSC im Bioreaktor Z® RP 6000 GMP Breeder



Abbildung 8: Z® RP 6000 GMP Breeder mit Kontrolleinheit

Für eine GMP konforme Expansion geeigneter MSC Populationen (mit gutem *in vitro* Mineralisierungspotential) wurden drei ausgewählte Populationen im Z® RP 6000 GMP Breeder (Fa. Zellwerk) unter hypoxischen Versuchsbedingungen in GMP kompatiblen Medium (mit 10% humanem AB-Serum) kultiviert und expandiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte gemäß dem Protokoll der Fa. Zellwerk (Berlin). Ziel des Versuchs war eine rasche Vermehrung der Zellen, da bei potentiellen klinischen Anwendungen sehr viel Zellmaterial benötigt wird.

Tabelle 9: Allgemeine technische Daten zum Reaktor

Einheit	Seriennummer
Breeder	H045
Kontroll-Einheit	H 060
Antrieb	H 039
pH-Elektrode	S 8201780 (29)
pO ₂ -Elektrode	S 8068126
Begasung	Overlaybegasung mit N ₂ / Luft und CO ₂

1.12 Passagieren

Für die Expansion der Zellen war je nach Experiment eine Ablösung und Neuaussaat der Zellen erforderlich. Die kultivierten Zelltypen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70- 80% kultiviert. Dann erfolgte die Abnahme des jeweiligen Kulturmediums und anschließend ein 1- 2 maliger Waschschrift mit PBS-Lösung. Nach diesem Schritt wird die Waschlösung dekantiert und eine Trypsinlösung (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L Versene®) in die Zellkulturflaschen bzw. Wells gegeben. Nach 5- 8 Minuten Inkubation (abhängig vom kultivierten Zelltyp) bei 37 °C erfolgte die optische Kontrolle der Zellablösung mittels Mikroskop. Bei kugelförmiger Ablösung der Zellen wird vorsichtig mehrmals geklopft um noch adhärierende Zellen abzulösen. Danach erfolgt die Zugabe des jeweiligen Kulturmedium (doppeltes Trypsinvolumen) um die Trypsinwirkung aufzuheben. Die Zellen wurde mittels einer Stabpipette vereinzelt. Anschließend wurde ein Zentrifugationsschritt durchgeführt. Nach der Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) erfolgte die Dekantierung des Medium/Trypsingemisches und die Resuspendierung des Zellpellets in einem definierten Mediumvolumen (frisches Kulturmedium) mit anschließender Bestimmung der Zellzahl und Vitalität (CASY Cell Counter TT, Roche). Die Zellen werden dann in der gewünschten Zelldichte in entsprechende Zellkulturgefäße ausgesät.

1.13 Bestimmung der Population Doubling Time (PDT)

Die Bestimmung der PDT erfolgte nach einer in der Literatur vielfach beschriebenen Formel:

Formel 1: Formel zur Bestimmung der Generationszeit.

$$P(t) = 2^{t/x} \cdot P(0)$$

Legende: P(0)= Ausgangszellmenge; P(t) = Zellmenge zum Zeitpunkt t; t= Zeit[h]; x= Generationszeit/Verdopplungszeit

1.14 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Alle kultivierten Zelltypen wurden in 1 ml des entsprechenden Kulturmediums ohne Antibiotikazusatz aufgenommen, mit 1 ml Einfriermedium (siehe Tabelle 10) gemischt und anschließend sofort in Einfrierboxen (mit Isopropanol befüllt) überführt. Der Einfriervorgang findet in vorgekühlten (-20°C) Einfrierboxen (Freezing Container, Nalgene) statt, die Proben werden in diesen Boxen für ca. 24 Stunden bei -80 °C gelagert bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Tabelle 10: Zusammensetzung Einfriermediums

Serum	60%-ig
DMSO	10%-ig
Grundmedium, des einzufrierenden Zelltyps	30%-ig

Je nach Zelltyp wurden unterschiedliche Sera verwendet (Thrombozytenlysat, humanes AB-Serum bzw. fetales Kälberserum).

Für den Auftauvorgang wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und unverzüglich im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde sofort in die 10 – 20-fache Menge frisches Kulturmedium überführt und

1. Im Fall von EPC und ECFC-Zellen: sofort ausgesät und nach einer Adhärenzphase von 4-6 Stunden ein Komplettwechsel des Mediums durchgeführt für die Entfernung von DMSO und toter Zellen oder

2. bei allen anderen Zelltypen wurde für die sofortige Entfernung von DMSO ein Zentrifugationsschritt durchgeführt. Nach der Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in einem definierten Mediumvolumen mit anschließender Bestimmung der Zellzahl und Vitalität (CASY Cell Counter TT, Roche). Die Zellen wurden dann in der gewünschten Zelldichte in entsprechende Zellkulturgefäße ausgesät.

1.15 Untersuchung des *In vitro*- Differenzierungspotentials

1.15.1 Bestimmung des osteogenen Differenzierungspotentials humaner und oviner MSC

Für die osteogene Differenzierung wurden hMSC in einer Dichte von 1000 Zellen / cm² in Kulturmedium ausgesät. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% wurde das Kulturmedium durch osteogenes Differenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) ersetzt. Nach 21 Tage Differenzierungszeit wurden die Zellen fixiert (10%- iger Formalinlösung, 15 Minuten, RT) und nach zwei Waschschritten (mit jeweils 2 ml Aqua Dest./ Well) mit Alizarinrot-Farbstoff angefärbt

(Färbung wie unter 1.5.1.1 beschrieben). Bei jeder Zellpopulation wurde stets eine undifferenzierte Negativkontrolle (in Kulturmedium) mitgeführt die ebenfalls fixiert und gefärbt wurde.

Tabelle 11: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums.

Mengen angaben [ml]	Inhaltsstoffe
387	Alpha MEM- Medium
100	Fetales Kälberserum (20%) bzw. humanes AB-Serum (20%)
5	Penicillin Streptomycin (10 000 Units/ml)
0,196	Dexamethason (Endkonzentration 1 μM)
1	Dinatrium-β-glycerophosphat (Endkonzentration 10 mM)
7,24	L-Ascorbinsäure 2- phosphat (Endkonzentration 50 μM)

Die Dokumentation der mineralisierten Proben bzw. Kontrollansätze erfolgt optisch durch Abschätzen der %- positiven Zellen sowie durch Fotos. Für eine quantitative Aussage der Mineralisierung wird der Alizarinrotassay in leicht abgewandelter Form nach Gregory et al. (Gregory, Gunn, Peister, & Prockop, 2004) durchgeführt. Dabei wurde nach dem Anfärben der Probenmatrices der Alizarinrot- Farbstoff durch eine Essigsäure- Extraktion wieder aus den angefärbten mineralischen Matrices gelöst um dann die Extinktion des gelösten Farbstoffs photometrisch bei 405 nm zu bestimmen.

1.15.2 Korrelation bestimmter Oberflächenmarker mit einem hohen osteogenen Potential von hMSC-Populationen

Es wird fortwährend nach neuen Oberflächenmarkern geforscht, die MSC-Subpopulationen charakterisieren welche durch ein besonders hohes Differenzierungspotential gekennzeichnet sind. Neue Ergebnisse zeigen, dass Oberflächenmarker wie GD2, SSEA-4, W8B2 oder CD146 mit einer hohen Multipotenz der Zellen assoziiert sind (Boulting et al., 2011b; Boxall & Jones, 2012; Guillot, Gotherstrom, Chan, Kurata, & Fisk, 2007; Martinez, Hofmann, Marino, Dominici, & Horwitz, 2007; Pilz et al., 2011; Rasini et al., 2013). Die beschriebenen Oberflächenmarker sollten in den Experimenten bei gut bzw. schlecht osteogen differenzierenden humanen MSC-Populationen mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Alle getesteten hMSC-Populationen entstammten dabei dem Knochenmark, folgende Faktoren wurden während des Experiments bei allen hMSC-Populationen konstant gehalten: Isolierungsmethode mittels Lymphoflot®-Gradienten, Aussaatdichte, Passage, Kulturmedium / osteogenes Medium. Die Fragestellung sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Qualität der osteogenen Differenzierung und der Anwesenheit der getesteten Oberflächenmarker besteht.

1.15.3 Bestimmung des chondrogenen Differenzierungspotentials von humanen und ovinen MSC

Für die chondrogene Differenzierung von humanen bzw. ovinen mesenchymalen Stammzellen wurden stets $2,5 \times 10^5$ Zellen im entsprechenden Kulturmedium in einem 15 ml PP-Röhrchen zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde

abgenommen und die Zellen in einem Milliliter chondrogenem Differenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 12) aufgenommen.

Tabelle 12: Zusammensetzung des chondrogenes Differenzierungsmediums (Fa.Lonza).

Mengen- angaben [ml]	Inhaltsstoffe
185	Differentiation chondrogenic basal media (Lonza)
1	Dexamethason
2	Ascorbat
2	ITS+ Supplement
2	Pyruvat
2	Prolin
2	Penicillin Streptomycin
4	Glutamat
0,02	Humanes TGF-β3 (Endkonzentration 100 ng)

Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (300 x g, 5 min, RT). Mit zwecks Gasaustausch leicht angedrehtem Deckel wurden die PP-Röhrchen mit dem Zellpellet bei 37 °C, 5% CO₂ für einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert (2 maliger Medienwechsel pro Woche mit jeweils 1 ml frisch angesetzttem chondrogenem Differenzierungsmedium). Nach Differenzierungsende wurden die Pellets vorsichtig aus dem Röhrchen entnommen, Dünnschnitte mittels Kryotom angefertigt und nachfolgend mit Alzianblau (siehe 1.5.1.4) bzw. Safranin O (siehe 1.5.1.3) gefärbt. Zusätzlich zur fotografischen Dokumentation der chondrogenen Matrixbildung wurden die Proben optisch auf ihre prozentuale Positivität geschätzt.

1.15.4 Bestimmung des adipogenen Differenzierungspotentials hMSC/oMSC

Für die adipogene Differenzierung von humanen bzw. ovinen mesenchymalen Stammzellen wurden 1000 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen ausgesät. Erreichte die Kultur eine Konfluenz von 80 -90%, wurde die adipogene Differenzierung gestartet. Für die Differenzierung wurden abwechselnd Induktions- und Maintenance- Medium zu den Zellen gegeben (jeweils 3-4 Tage). Beginnend mit Induktionsmedium wurden so 3 Zyklen (entsprechen 3 Wochen) durchgeführt und die Zellen dann mit Ölrot gefärbt (siehe Abschnitt 1.5.1.2).

Tabelle 13: Zusammensetzung des adipogenen Induktionsmediums.

Mengenangaben [ml]	Inhaltsstoffe adipogenes Induktionsmedium
170	Adipogenes Induktions Medium (Lonza)
2	rh- Insulin
4	L-Glutamin
20	MSGS
1	Dexamethason
0,4	Indomethacin
0,2	IBMX
0,2	GA-1000

Tabelle 14: Zusammensetzung des adipogenen Maintenance-Mediums.

Mengenangaben [ml]	Inhaltsstoffe adipogenes Maintenance-Medium
170	Adipogenes Maintenance Medium (Lonza)
2	h- Insulin
4	L-Glutamin
20	MSGS
0,2	GA-1000

Zusätzlich zur fotografischen Dokumentation der adipogen differenzierten Zellen (intrazelluläre Lipidtropfen) wurden die Proben optisch auf ihre prozentuale Positivität geschätzt.

1.15.5 Bestimmung des Angiogenesepotentials von EPCs mittels Tubeformation-Assay

Die Ausformung kapillar-ähnlicher Strukturen auf einer künstlichen Basalmembranmatrix (Matrigel) ist ein typisches Merkmal von Endothelzellen. Das Matrigel, ein Modellsystem der extrazellulären Matrix, setzt sich hauptsächlich aus folgenden Komponenten zusammen: Laminin, Kollagen Typ IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykan (Grant et al., 1985; Kleinman et al., 1982). Matrigel wird verwendet, um die Differenzierung unterschiedlicher Zellen u.a. Endothelzellen zu erforschen (Kubota, Kleinman, Martin, & Lawley, 1988). Es dient des Weiteren als Substrat um das Angiogenese-Potential endothelialer Zellen (Ausbildung von Kapillaren) zu analysieren. Der Tubeformation-Assay wurde (in leicht abgewandelter Form) entsprechend dem Herstellerprotokoll (ibidi GmbH) durchgeführt.

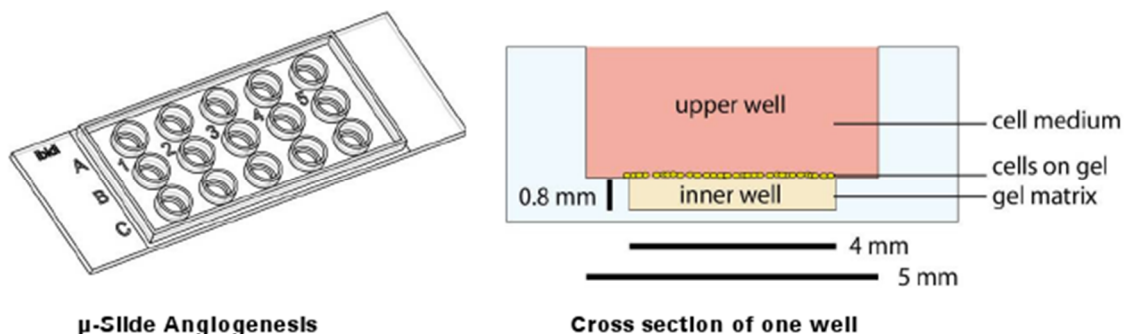


Abbildung 9: ibidi-Kammer (µ-Slide Angiogenesis, ibiTreat) mit Querschnitts-Ansicht (Quelle: ibidi).

In jede Vertiefung der ibidi-Kammer (μ -Slide Angiogenese, ibiTreat siehe Abbildung 9) wurden 10 μ l vorgekühlte Matrigel™-Lösung pipettiert und anschließend bei 37 °C, 5% CO₂ im Inkubator geliert. Die Zellen wurden in Endothelial Cell Growth Media (PromoCell) aufgenommen und in einem Volumen von 50 μ l mit der entsprechenden Zellzahl pro Vertiefung pipettiert. Die Zellzahl wurde -wie auch vom Hersteller empfohlen- angepasst (die Zellgröße und -zahl sind ein entscheidender Faktor für die Ausbildung von tubes). Bei jeder Zellpopulation wurde eine niedrige (12 500 Zellen pro Well) und eine hohe Zellkonzentration (25 000 Zellen pro Well) getestet- die Konzentration bei der die besten optischen Resultate erzielt wurden, wurde photographisch dokumentiert. Die Inkubationsdauer bis zur Ausbildung von Tubes variierte je nach Zelltyp zwischen 3 und 12 Stunden.

1.15.6 **DIL-Ac-LDL-Uptake**

Endothelzellen besitzen die Eigenschaft acetyliertes Low-Density Lipoprotein (LDL) über den Scavenger Signalweg des LDL Metabolismus aufzunehmen. Diese Eigenschaft kann verwendet werden um Endothelzellen von anderen Zelltypen zu unterscheiden und klar zu identifizieren. Für die Bestimmung wird 10 μ g/ml (in Kulturmedium verdünnt) des Fluoreszenz-markierten 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine Perchlorate (Dil-Ac-LDL) für einen Zeitraum von vier Stunden zu den potentiellen Endothelzellen gegeben (Voyta et al., 1984). In dieser niedrigen Konzentration hat das fluoreszenzmarkierte Dil-Ac-LDL keinen Einfluss auf die Wachstumsrate. Mit dieser Methode können auch in frühen Passagen Endothelzellen schnell identifiziert werden gegenüber anderen konventionellen Methoden.

1.16 Besiedelungsstrategien für osteogene Trägermaterialien

Je nach Beschaffenheit der unterschiedlichen Testmaterialien mussten verschiedene Besiedelungsstrategien angewendet werden. Die am häufigsten gewählte Besiedelungsmethode war die im Folgenden sogenannte „konventionelle Besiedelung“.

1.16.1 Konventionelle Besiedelung

Meistens wurde die sog. konventionelle Besiedelungsstrategie angewandt. Bei dieser Methode wurde die Zellsuspension direkt auf den Träger aufgebracht (die Zellkonzentration und das Volumen variierte je nach Größe und Beschaffenheit des Materials) nach einer Adhäsionsphase (Zelltypabhängig zwischen 1 und 3 Stunden) wurde das Trägermaterial um 180° gedreht und von der gegenüberliegenden Seite ebenfalls mit Zellen besiedelt. Nach einer weiteren Adhäsionsphase, (zeitlich entsprechend der ersten Adhäsionsphase) wurden die Trägermaterialien dann vorsichtig in neue Kulturgefäße mit frischem Kulturmedium überführt.

1.16.2 Vakuumbesiedelung

Für eine homogenere Verteilung der Zellen im Material wurde die Vakuumbesiedelungsmethode für das in der Entwicklung befindliche Polyurethan-Material getestet. Die nachfolgende Beschreibung der Vakuumbesiedelungsmethode wurde in abgewandelter Form aus der Arbeitsanweisung der Fa. Aesculap (B. Braun,

Melungen) übernommen. Die Vakuumbbeutel wurden steril durch die Fa. Aesculap AG geliefert. Durch das Entfernen der Siegellasse wurde am oberen Ende ein steriles Einspritz-Septum freigelegt. Die vorbereitete Zellsuspension wurde mittels einer Spritze mit großer Kanülenöffnung (Öffnung: 20 G) aufgezogen und das Einspritz-Septum durchstoßen. Hierbei musste beachtet werden, dass die Kanüle möglichst tief in den Port eingeführt werden musste (ohne jedoch die Folie des Vakuumbteils zu beschädigen). Zur Beladung des Materials mit Zellen (siehe Abbildung 10) wurde die Zellsuspension aus der Spritze gedrückt. Durch das Einspritzen wurde das anliegende Vakuum sofort aufgehoben und die Zellen in Sekundenbruchteil in das Material „aufgesogen“.

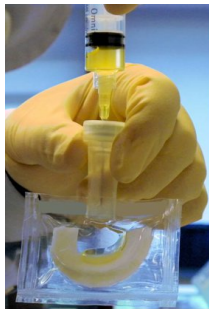


Abbildung 10: Einspritzen der Zellsuspension in den Vakuumbbeutel (Quelle: Aesculap AG, Tuttlingen).

1.16.3 Besiedelung der Testmaterialien mittels Kanüle

Nach dem Ablösen der konfluenten Zellschicht wurden die Zellen gründlich resuspendiert und in einem definierten Volumen (abhängig von Größe und Beschaffenheit des Materials) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann über eine Spritze mit Kanüle aufgenommen und direkt in das jeweilige Material injiziert.

1.17 Überprüfung der Besiedelungseffizienz

Für die Überprüfung der Besiedelungseffizienz wurden auf dem Boden der Kulturgefäße adhärierende Zellen nach der Besiedelungsphase trypsinisiert und ausgezählt, so konnte auf die am jeweiligen Trägermaterial haftende Zellzahl geschlossen werden (verwendete Ausgangszellzahl - am Boden haftende Zellen). Des Weiteren wurden histologische Schnitte der Materialien angefertigt und mit DAPI, Phalloidin, Coomassie Blue, Alizarinrot oder Kristallviolett gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Von den Testmaterialien wurden zudem rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht (mit Unterstützung der Fa. Translumina®, Hechingen).

1.18 Zellvitalitätstest

1.18.1 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Dieses Testverfahren basiert auf einer kolorimetrischen Umsetzung zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in Kulturen. Das Testkit besteht aus einer Tetrazolium Komponente (MTS: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], und einem elektronenübertragenden Reagenz (Phenazine Ethosulfate, PES). Die Tetrazolium- Komponente wird durch das PES in der Lösung stabilisiert. Durch metabolisch aktive Zellen findet eine Reduktion des MTS-Farbstoffs in das farbige Endprodukt (Formazan) statt. Dieses kann photometrisch bei 490 nm nachgewiesen werden. Hierbei ist die Menge des umgesetzten Formazan-Produkts direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Die

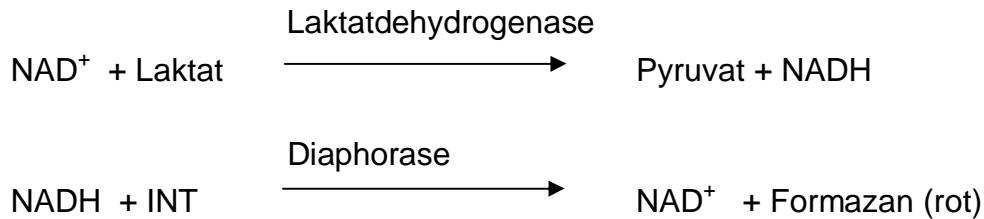
Durchführung des Zellproliferationsassays erfolgte nach den Herstellerangaben der Fa. Promega. Bei der Durchführung eines Proliferationstests wurde volumenabhängig eine definierte Menge der CellTiter 96® AQueous One Solution direkt zu den Zellen in die Kulturwells gegeben (20 µl Farbstofflösung pro 100 µl Kulturmedium). Nach einer Inkubationszeit von 1-4 Stunden wurden 150 µl- Aliquots entnommen und photometrisch gemessen (3-fach Bestimmung).

1.19 Zytotoxizitätstest

1.19.1 CytoTox96® Non-radioactive Cytotoxicity Assay

Der Zytotoxizitätsassay der Fa. Promega (Madison, USA) wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt (siehe Technical Bulletin #TB163). Im Gegensatz zu radioaktiven Zytotoxizitätsassays wird bei diesem Test quantitativ die Freisetzung des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) aus geschädigten Zellen bestimmt. Kommt es aufgrund toxischer Substanzen im Versuchsansatz zu einer Zell-Lyse wird das Enzym LDH aus dem Zytosol in den Kulturüberstand freigesetzt. Dort führt es unter Reduktion des Coenzym Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zur Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Das reduzierte Coenzym NADH wird in einer nachfolgenden enzymatischen Reaktion (durch das Enzym Diaphorase) wieder oxidiert wobei das farblose Tetrazoliumsalz (INT) in ein rotes Formazan-Produkt reduziert wird.

Formel 2: Enzymatische Reaktion des CytoTox 96® Assays.



Die Menge umgesetzten Farbstoffs ist proportional zur Anzahl lysierter Zellen. Der prozentuale Anteil an lysierten Zellen kann anhand der photometrischen Bestimmung des Farbstoffanteils bei 490 nm berechnet werden.

1.19.2 Zytotoxizitätstest mittels AlamarBlue-Assay

Dieser Test wurde vom NMI (Abt. Regenerative Medizin, Reutlingen) durchgeführt um die synthetischen Knochenersatzmaterialien auf ihre Zellverträglichkeit zu testen. Die Grundlage des Assays basiert auf der Reduktion des blauen AlamarBlue Farbstoffs (Resazurin) zu Resorfurin (pink) durch die Zellen (entsprechend ihrer metabolischen Aktivität). Der Nachweis des Resorfurin-Farbstoffs erfolgt fluorometrisch bei 530 – 560 nm. Das Testsystem eignet sich für eine Voraussage auf mögliche zytotoxische Reaktionen beim Menschen und korreliert gut mit Tierversuchsergebnissen. Aus dem zu untersuchenden Material wurde ein Extrakt hergestellt, dieses wurde in definierten Verdünnungen auf L929-Zellen (Fibroblasten, Maus) gegeben. Der Test erfolgt nach den Prüfrichtlinien ISO 10993-5: 1999 „Tests for in vitro cytotoxicity“ und ISO 10993-12: 2002 „Sample preparation and reference materials“.

1.20 Osteogene Differenzierung auf Trägern

Nach der Besiedelung des jeweiligen Knochenersatzmaterials mit Zellen (ovinen MSC bzw. hMSC bzw. SAOS-2-Zellen) folgte zunächst eine „Akklimatisierungs- und Wachstumsphase“ bevor die Zellen osteogen differenziert wurden. Die osteogene Differenzierung erfolgte durch den Austausch des jeweiligen Kulturmediums (in dem die Zellen auf dem Knochenersatzmaterial kultiviert und expandiert wurden) durch ein osteogenes Differenzierungsmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 11). Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen unterschiedlich lange osteogen differenziert und anschließend entsprechend angefärbt bzw. rasterelektronenmikroskopisch ausgewertet bzw. auf ihre reversible Kompressibilität hin untersucht.

1.21 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem Standardprotokoll für Monolayer-Zellen der Fa. Peqlab (peqGOLD Trifast™) bzw. der Fa. Ambion life technologies (TRIzol® Reagent). Das Verfahren basiert auf der sog. Single-step-Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Das im TRIzol® enthaltene Guanidiniumthiocyanat führt zur Zell-Lyse und zur Zerstörung von RNAsen und anderen Enzymen. Ein weiterer Bestandteil des TRIzol®- Reagenzes ist Phenol. Im Phenol löst sich die RNA, durch die Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation kommt es zur Phasentrennung. Nach dem Zentrifugationsschritt sind drei Phasen zu erkennen. Die oberste, wässrige Phase enthält die RNA, die Interphase enthält DNA während sich in der dritten Phase Proteine anreichern. Die obere Phase wird abgenommen und anschließend mit Isopropanol und Ethanol

präzipitiert. Nach zwei Waschschritten wird die RNA in RNase freiem Wasser gelöst und mittels eines ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies) auf ihre Konzentration und Reinheit geprüft.

1.22 Flusszytometrie

Für die direkte Antikörper-Markierung wurden die Zellen nach dem Abtrypsinieren (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L Versene®) für eine Stunde in Kulturmedium belassen (4 °C), danach in definierter Zellzahl in Polystyren-Röhrchen überführt (100 000 Zellen/Röhrchen). Dann erfolgten zwei Waschschrritte mit jeweils 2 ml FACS-Puffer (Zusammensetzung: 500 ml PBS+ 5 g BSA+ 500 µl FCS). Das Zentrifugieren der Proben erfolgte bei 300 x g für jeweils 5 Minuten bei 4 °C. Nach dem Abnehmen des Überstands wurde das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Antikörperlösung in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration zugegeben (10 µl/ Ansatz). Nach einer 30 minütigen Inkubationsphase bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen erneut 2 mal mit jeweils 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet vorsichtig in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. 4 Minuten vor der FACS-Messung wurde 3 µl einer 7AAD-Lösung zu jedem Ansatz pipettiert. 7AAD interkaliert in doppelsträngige DNA – zwischen die Basen Cytosin und Guanin- und kann nur durch die Zellmembran toter Zellen ins Zellinnere eindringen (Luttmann, Bratke, Küpper et al., 2014). Mit dieser Todfärbung konnte die Expression des jeweiligen Oberflächenmoleküls auf ausschließlich vitalen Zellen gewährleistet werden. Die Messung erfolgte mit einem FACScan-Gerät der Fa. BD Biosciences.

1.23 Besiedelung synthetischer Knochenimplantate

Für synthetische Knochenersatzmaterialien eignen sich Trikalziumphosphat und Hydroxylapatit-Keramiken besonders gut, da sie aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zum Knochenmineral eine sehr hohe Biokompatibilität aufweisen (Winter et al., 1981) und keine immunologischen Reaktionen auslösen oder karzinogene Eigenschaften besitzen (Osborn & Newesely, 1980). Wie zahlreiche tierexperimentelle Studien zeigen wird Hydroxylapatit (Summenformel HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) schlecht *in vivo* degradiert während Trikalziumphosphat (Summenformel TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) gut biologisch resorbierbar ist (Köster et al., 1977 und Cutright et al., 1972 und Levin et al., 1975). Auch ihr Einsatz bei Knochendefekten kritischer Größe in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen wurde erfolgreich demonstriert (Bruder et al., 1998; Kon et al., 2000; Quarto et al., 2001). Es gibt aber immer noch Bedarf die optimalen Zell-Matrix Konstrukte zu bestimmen und ebenso die besten Kultivierungsbedingungen für ein optimales Zellwachstum und -differenzierung zu finden.

1.23.1 Kollagen-/Mineralimplantate: HA,TCP,HA-TCP-Konstrukte

Bei diesen drei Knochenersatzmaterialien handelt es sich um Eigenprodukte der Fa. Aesculap (B. Braun, Melsungen, Deutschland). Die drei Trägermaterialien bestehen aus einem elastischem Kollagenschwamm (44% Kollagenanteil) ergänzt mit mineralischen Komponenten (je 56%) mit einer Porengröße von 50 bis 350 μm . Die Trägerkonstrukte zeichnen sich durch eine schnelle Resorption *in vivo* sowie durch

einen langanhaltende 3D-Struktur aus. Zudem besitzen alle drei Materialien osteokonduktive Eigenschaften.

Tabelle 15: Zusammensetzung der mineralisch-organischen Trägerkonstrukte.

Materialbezeichnung	Mineralische Komponente	Organische Komponente
Hydroxylapatit (HA)	HA 56%	bovines Kollagen 44%
Tricalciumphosphat (TCP)	TCP 56%	bovines Kollagen 44%
Hydroxylapatit-Tricalciumphosphat (HA-TCP)	HA 28% TCP 28%	bovines Kollagen 44%

Alle drei Kollagen-/Mineralkonstrukte wurden auf ihre Zellkompatibilität und osteogene Differenzierbarkeit der MSCs auf dem Material geprüft. Auch die mechanischen Eigenschaften der drei Materialien wurden mittels Rückstellkraftmessungen getestet. Mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen wurden die mikrostrukturellen Veränderungen des Materials nach der Zellbesiedelung bzw. im Verlauf der osteogenen Differenzierung *in vitro* untersucht.

1.23.2 Nanogel®

Beim Knochenersatzmaterial Nanogel® handelt es sich um ein klinisch zugelassenes apatitisches Gel der Fa. Teknimed (Vic en Bigorre, Frankreich) für den osteokonduktiven Knochenersatz. Es besteht zu 70% aus Wasser und zu 30% aus Kalziumphosphat. Laut Hersteller ist es für das Auffüllen von Knochendefekten, die keine Auswirkung auf die Stabilität der Knochenstruktur haben, geeignet. Zu diesen Defekten gehören u. a. das Auffüllen von Knochendefekten nach chirurgischer Reinigung der Knochenwand (Zysten oder gutartige Tumore), Knochendefekten

aufgrund von Verletzungen oder das Auffüllen von zervikalen oder lumbalen Cages. Auch in der Zahn- und Kieferchirurgie kann das Material für das Auffüllen von Knochendefekten nach chirurgischer Resektion der Knochenwand (Zysten oder gutartige Tumore), Knochendefekten aufgrund von Verletzungen oder aber bei der Behandlung von Knochenleistendefekten verwendet werden. An Stellen mit hoher mechanischer Belastung kann das Nanogel®-Material zudem mit anderen (mechanisch stabilen) Osteosynthesematerialien kombiniert werden. Das Nanogel®-Material wird langsam resorbiert und wird im Laufe der Zeit lt. Hersteller durch spendereigenes, neugebildetes Knochengewebe ersetzt. Das Produkt ist sterilisiert und gebrauchsfertig in verschiedenen Packungsgrößen (0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml und 5 ml) erhältlich. Nach Herstellerangaben sind im klinischen Einsatz bis dato keinerlei Nebenwirkungen beobachtet worden.

1.23.3 Hydroxylapatit-Partikel (HA-Partikel)

Der hier verwendete Kalziumphosphat-Hydroxylapatit der Fa. Teknimed (Vic en Bigorre, Frankreich) mit der Summenformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ gehört zur kristallographischen Familie der Apatite (mit hexagonaler Struktur). Diese Kalziumphosphatzusammensetzung wird meistens für die Herstellung von Biomaterialien für den Knochenersatz verwendet. Bei den hier eingesetzten HA-Partikeln handelt es sich um die Grundsubstanz für die Herstellung von medizinischen Devices (orthopädische bzw. dentale Implantate) mit einer hohen Biokompatibilität und bioaktiven Eigenschaften. Das HA-Puder ist in verschiedenen Partikelgrößen erhältlich (0- 30 μm ; 30- 50 μm , 50- 80 μm sowie 80- 200 μm). Bei den im Versuch verwendeten HA-Partikeln wurde eine Größe von 80- 200 μm gewählt.

1.23.4 **TriHA+®- Kalziumphosphat Keramik**

Das TriHA+®-Material besteht aus einem Trikalziumphosphat, welches eine höhere Resorptionsgeschwindigkeit aufweist als Hydroxylapatit. Das TriHA+®-Material besitzt eine sehr hohe Porosität (60- 80% offene Poren). Es dient dem Auffüllen von Knochendefekten (Knochenhohlräume oder Spalten im Knochengerüst), die nicht intrinsisch für die Stabilität der Knochenstruktur sind. TriHA+® ist indiziert für die Behandlung von Knochendefekten, welche sowohl durch chirurgische Eingriffe, als auch durch Knochenfrakturen entstanden sein können (lt. Hersteller). Es ist jedoch wegen seiner geringen mechanischen Belastbarkeit ungeeignet zur Behandlung großflächiger Defekte. Es wird zur Behandlung orthopädischer Frakturen eingesetzt (Hüftgelenkspfanne, Hüftprothesen) oder bei Kiefer- und Gesichtsoptionen (Auffüllen von Zysten, Alveolartaschen, Osteoplastik, etc.). Im Verlauf der Knochenheilung wird das Material resorbiert und durch neu gebildetes Knochengewebe ersetzt. Das TriHA+ Material wird sterilisiert in Form von kleinen Würfeln (3x 3x 3x mm) oder Sticks (5x 5x 20 mm) vom Hersteller angeboten. Bei den in den Versuchen verwendeten TriHA+-Kalziumphosphat Keramiken handelte es sich um die Würfel-Form.

1.23.5 **Ceraform®Revolution**

Ceraform® Revolution ist ein synthetisches Knochenersatzmaterial der Fa. Teknimed (Vic en Bigorre, Frankreich), bestehend aus einer Mischung aus Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat welches in seiner Zusammensetzung stark dem Aufbau von menschlichem Knochen ähnelt. Laut Herstellerangaben ermöglicht die hohe

Porosität des Materials eine bessere Gefäßneubildung bis ins Innere des eingesetzten Materialstücks und eine progressive Entwicklung von neuen Knochenzellen sowie eine Resorption durch das sogenannte „creeping substitution“ (kontinuierliche Erneuerung des Knochens). Das Ceraform® Revolution Material eignet sich ausschließlich für das Auffüllen von Knochenhohlräumen und –spalten, die nicht für die Stabilität der Knochenstruktur bedeutend sind. Das Material wird für das Auffüllen von kleinflächigen Knochendefekten im Knochengerüst (Extremitäten, Wirbelsäule und Becken) verwendet. Nach der Platzierung im Areal des Knochendefekts resorbiert das Kalziumphosphatgerüst des Materials und wird während des Heilungsprozesses durch neugebildetes Knochengewebe substituiert.

1.23.6 **Polyurethan-Schaum (PU-Schaum)**

1958 wurde erstmals die Verwendung eines Polyurethan-Schaums zur Heilung von Knochendefekten von Mandarino und Salvatore beschrieben (Mandarino & Salvatore, 1958). In tierischen Studien wiesen sie nach, dass das synthetische Polymer schrittweise in einem Zeitraum von 18- 24 Monaten durch Knochen ersetzt wurde. In einer klinischen Studie von Redler et al. am Menschen zeigte der Einsatz dieses synthetischen Polymers jedoch vorwiegend negative Ergebnisse (Redler, Brown, & Trekell, 1960). Bei 42 Patienten wurde das synthetische Material eingesetzt (insgesamt 51 Knochenbrüche) es kam jedoch nur in 9 Fällen zu einer vollständigen Knochenfusion, in 5 Fällen zu einer Stabilisierung des Bruchs jedoch ohne vollständige Fusion und in 37 Fällen blieb die Knochenheilung aus. Außerdem traten bei 21 der 51 Operationen Wundinfektionen auf. Die Autoren empfahlen entsprechend ihren Versuchsergebnissen auf die Verwendung von Polymeren bei

der Knochenheilung zu verzichten. Das Material wurde für diese Studie frisch während der Operation angesetzt (Prepolymer+ Katalysator) bei der Reaktion dieser beiden Komponenten wurde CO₂ freigesetzt, welches zu einer Schaum-artigen Konsistenz des Polyurethans führte. Die Materialeigenschaften dieses starren, unelastischen Polymers erwiesen sich jedoch als negativ für den Einsatz bei Knochendefekten. Hier spielte vor allem die Ablösung des Polymers vom Knochen bzw. das Zerbrechen des Polymers eine Rolle. Im Laufe der folgenden Jahre gab es dann neue Ansätze dieses Material, in veränderter Form, im Bereich der Knochenregeneration einzusetzen (Kavlock, Pechar, Hollinger, Guelcher, & Goldstein, 2007; Klawitter et al., 1976; Thompson F.R., 1962).

Bei dem in unseren Experimenten getesteten Polyurethan-Material (PU-Schaum) handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Produkt der Fa. Aesculap (B. Braun Melsungen, Deutschland), das in einem laufenden Entwicklungsprozess getestet wurde und aufgrund patentrechtlicher Gründe chemisch nicht näher beschrieben werden kann. Es handelt sich um ein elastisches, poröses (Porengröße variiert zwischen 50- 400 µm), nicht-lasttragendes Material welches für seinen Einsatz als Knochenersatzmaterial in Kombination mit einer Stabilisierung des Bruches durch einen Fixierungselement (Fixateur externe) vorgesehen ist. Der Schaum ähnelt einem trapezförmigen Schwamm mit konvexen Längsseiten. Die ersten Versuche wurden mit einem Prototypen durchgeführt (PU-Schaum I) welcher im Verlauf des Entwicklungsprozesses auf Zellkompatibilität und -toxizität hin optimiert wurde (PU-Schaum II).

1.23.7 **Osteovit®**

Beim Osteovit®-Material handelt es sich um ein Aesculap-Produkt mit klinischer Zulassung, einer resorbierbaren Kollagenmatrix bovinen Ursprungs die zum Auffüllen von Knochendefekten eingesetzt wird. Laut Hersteller besitzt das Material eine gute Gewebekompatibilität, gute Resorbierbarkeit und die poröse Kollagenstruktur fördert das Einsprossen von körpereigenem Gewebe. Die Form der Osteovit®-Würfel können im trockenen und nassen Zustand dem Knochendefekt angepasst werden. Das Knochenersatzmaterial ähnelt vom Aufbau einem porösen Schwamm und ist in folgenden Maßen erhältlich (2 x 2 x 1 cm bzw. 1,5 x 1,5 x 0,5 cm bzw. 1 x 1 x 1 cm). Das Material wird z.B. zum Auffüllen von Knochendefekten nach Tumor- und Zystenresektion in der Orthopädie oder der Kiefer- und Gesichtschirurgie verwendet. Es diente für diese Arbeit als Referenzmaterial zum Polyurethan-Schaum und wurde *in vivo* im Schaf getestet.

1.23.8 **Actifit®**

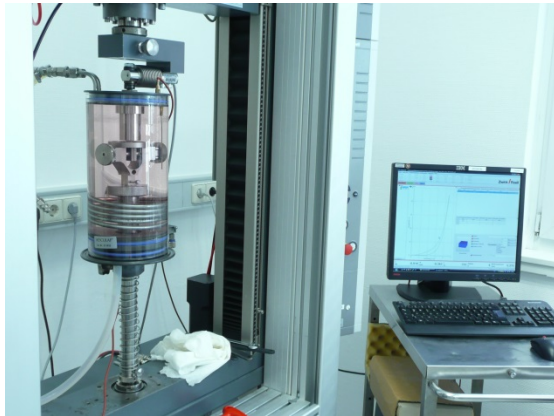
Beim Actifit®-Material handelt es sich um ein synthetisches, abbaubares Polymer mit stark vernetzter Porenstruktur. Actifit® wird lt. Hersteller (Orteq® Ltd.) arthroskopisch in den Meniskus eines Patienten eingesetzt und fördert das Einwachsen von körpereigenem Gewebe. Es soll als „Stoßdämpfer“ zur Linderung der Schmerzen und zur Wiederherstellung der funktionalen Beweglichkeit des Patienten dienen. Es wird sowohl bei partiellem Meniskusverlust wie auch bei Meniskusschädigungen eingesetzt. Das Polyurethan-Polymer wurde in klinischen Studien bereits mit positivem Ergebnis getestet (Verdonk et al., 2012). Bei 92,5% der Patienten stellte

sich 2 Jahre nach dem operativen Eingriff eine deutliche Besserung und Stabilisierung des geschädigten Meniskusbereichs ein. In der vorliegenden Arbeit diente es aufgrund seines Ausgangsmaterials Polyurethan lediglich als Vergleichsmaterial zu dem von Aesculap selbst synthetisierten PU-Schaum.

1.24 Bestimmung der mechanische Stabilität mittels Rückstellkraftmessung

1.24.1 HA, TCP und HA-TCP Konstrukte

Die drei Kollagen-/Mineralimplantate HA, TCP und HA-TCP wurden auf ihre reversible Kompressibilität hin untersucht, um den Einfluss der Besiedelung mit humanen MSCs sowie deren osteogener Differenzierung auf die Materialeigenschaften zu prüfen. Die Messung der Rückstellkraft erfolgt nach einer standardisierten Methode der Fa. Aesculap (B. Braun, Tuttlingen, Deutschland). Für die Kompressibilitätsmessung wurde eine Zwick-Zugprüfmaschine (Typ Z020) verwendet. Für die Messung wurden die Prüfgegenstände in einen Mediumbehälter mit Temperiereinheit überführt (Wärmethermostat LAUDA Ecoline Starediton E 306). Die Testung der Materialien erfolgte in Kulturmedium bei 37 °C (+/- 0,01 °C).



**Abbildung 11: Testaufbau Zwickprüfmaschine
mit Kontrolleinheit**

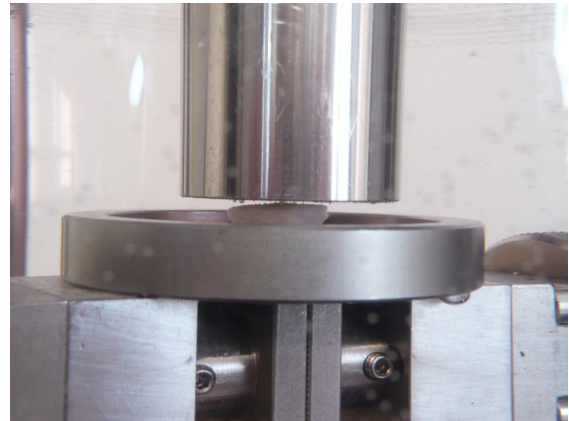


Abbildung 12: Stempel zur Probenapplikation.

Prüfparameter: Prüfungsgeschwindigkeit: 2 mm/min; Kraftaufnehmer: 50 N (relative Toleranzabweichung: +/- 0,12%); Probengröße: 20 mm x 20 mm

Die drei Kollagen-/Mineralimplantate HA, TCP und HA-TCP werden nach einer Spülung mit Kulturmedium für hMSC (Alpha MEM Medium + 10% humanes AB-Serum + 1% Penicillin Streptomycin) beidseitig mit Stammzellen besiedelt. Die Besiedelung wurde wie in 1.16.1 „konventionelle Besiedelung“ beschrieben von beiden Seiten durchgeführt (jeweils 400 000 Zellen pro Seite).

Nach einer Wachstumsphase von 14 Tagen wurde pro Material und Zellpopulation eine Probe in ein osteogenes Differenzierungsmedium gegeben (Zusammensetzung siehe Tabelle 11). Die Berechnung des komprimierten Anteils erfolgte über die Aufzeichnung des Weges bei einer Kraft von 0,5 N. Die erste Messung gab dabei die Ausgangsdicke des Prüfkörpers wieder. Nach einer Relaxationszeit von 30 sec bzw. 10 min wurde die zurückgelegte Strecke erneut bei einer Kraft von 0,5 N bestimmt.

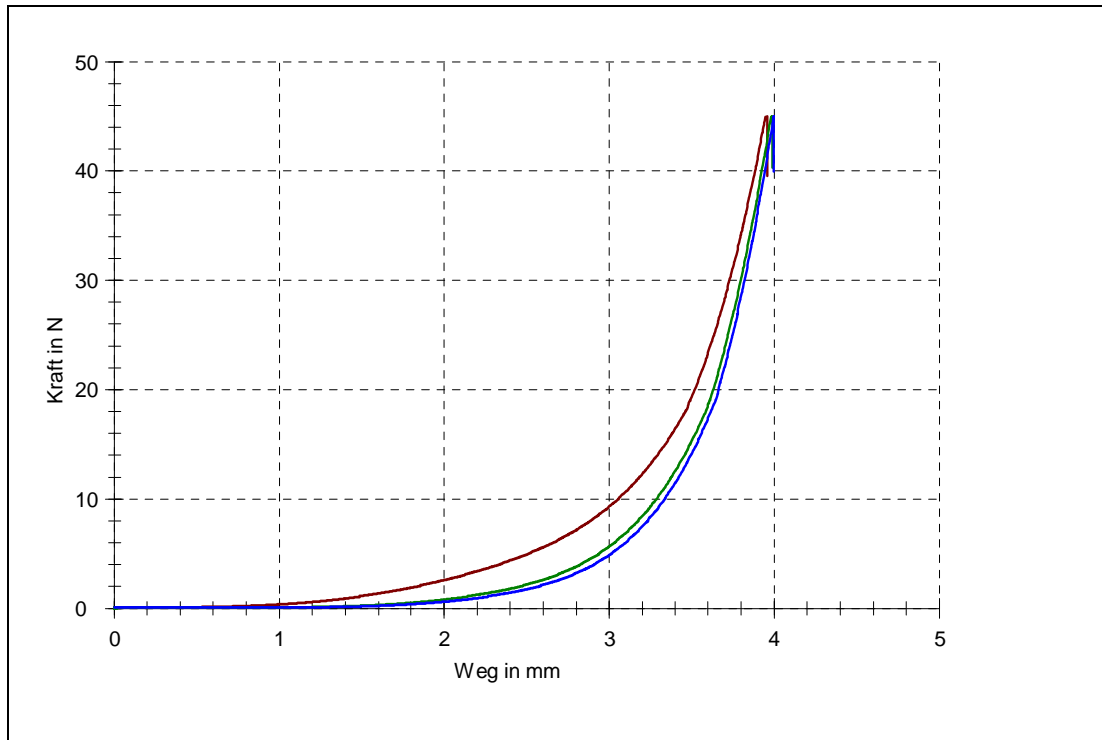


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung einer Materialprüfung (Quelle: Fa.Aesculap). Legende: rot: Ausgangszustand der Probe; grün: nach einer Relaxationszeit von 30sec; blau: nach einer Relaxationszeit von 10min.)

Der komprimierte Anteil der Probe wird nach Ermittlung der Wegdifferenz nach einer Relaxationszeit von 30 sec bzw. 10 min über die nachfolgenden Gleichungen bestimmt:

Formel 3: Berechnung der ΔW – Werte nach 30 Sekunden. bzw. 10 Minuten.

$$\Delta W_{30 \text{ sec.}} = W_{2.F0,5N} - W_{1.F0,5N}$$

$$\Delta W_{10 \text{ min.}} = W_{3.F0,5N} - W_{1.F0,5N}$$

Legende:

$W_{1.F0,5N}$ = Ausgangsdicke: Messweg bei einer Kraft von 0,5N,

$W_{2.F0,5N}$ = Dicke nach erster Kompression bei einer Kraft von 0,5N und einer 30sec. Relaxation,

$W_{3.F0,5N}$ = Dicke nach zweiter Kompression bei einer Kraft von 0,5N und einer 10min. Relaxation

Formel 4: Berechnung des komprimierten Anteils nach einer Relaxation von 30 sec bzw. 10 min.

$$\text{Anteil}_{\text{Komprimiert:30 sec/10 min}} = \frac{\Delta W_{30 \text{ sec/10 min}}}{H_p} \cdot 100\%$$

H_p = Ausgangsdicke (gemessen mit digitalem Messschieber).

1.25 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit freundlicher Unterstützung der Fa. Translumina (Hechingen, Deutschland) angefertigt. Die Proben wurden fixiert (in 4%-iger Formalinlösung), für die Aufnahmen wurde ein Gerät der Fa. Hitachi verwendet (TM-1000, Tablet Microscope, Ser.Nr. 0718-05).

1.26 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen

Die TEM- Aufnahmen wurden mit freundlicher Unterstützung des Interfakultären Instituts für Biochemie (Arbeitsgruppe Duszenko) angefertigt. Nach Fixierung der Proben mit 2%-iger Glutaraldehyd Lösung (in Cacodylatpuffer) wurden die Proben zunächst vier Mal in Cacodylatpuffer gewaschen (jeweils für 10 Minuten). Anschließend folgte die Kontrastierung der Proben mit 1,5%- igem Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer für eine Stunde (0,5 ml / Probe). Danach wurde eine Serie an Waschschritten durchgeführt (3 x 10 Minuten mit Cacodylatpuffer, 3 x 10 Minuten in H₂O). Das Waschen erfolgte jeweils durch die Zugabe der Waschlösung, vollständiges Vermischen der Probe mit der Waschlösung durch vorsichtiges

Schütteln, Inkubationszeit und anschließender Zentrifugation der Proben (30 Sek., 13 000 rpm). Im nächsten Schritt wurde 0,5 ml Uranylacetat (in H₂O) zu den Proben gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde einmal mit 1 ml H₂O für 10 Minuten gewaschen. Nach der Fixierung und Kontrastierung fand die Entwässerung der Proben statt. Jede Probe wurde mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 95%) behandelt, danach jeweils dreimal mit 100% EtOH und Propylenoxid (dazwischen wurde zentrifugiert jeweils 30 Sek., RT, 13 000 rpm). Nach der vollständigen Entwässerung fand eine Einbettung der Proben in Harzlösung statt : zunächst mit 50% Eponharz in Propylenoxid (Zentrifugationszeit 4 Minuten) und dann wurden die Proben in BEEM-Cups mit reinem Eponharz überführt (Zentrifugationszeit 25 Minuten). Für die Polymerisation wurden die Proben in der Harzlösung zunächst für 12 Stunden bei 45 °C inkubiert und danach für 24 Stunden bei 60 °C. In der Harzlösung befanden sich neben dem Epoxidharz noch zwei Härter (DDSA und MNA) sowie der Beschleuniger BDMA. Die Schnittdicken betrugen zwischen 60 und 90 Nanometer. Für die TEM-Aufnahmen wurde das Gerät Zeiss EM10 verwendet.

1.27 Fixierung der Knochenersatzmaterialien

Das Fixieren der besiedelten und unbesiedelten Trägermaterialien erfolgte in 4%-iger Formaldehydlösung in der die Trägermaterialien je nach Größe zwischen 0,5 und einer Stunde bei Raumtemperatur fixiert wurden. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS-Lösung.

1.28 Anfertigen von Dünnschnitten

Die verschiedenen Knochenersatzmaterialien wurden 24 Stunden vor dem Schneiden in eine 20%-ige Sucrose Lösung überführt. Die Trägermaterialien wurden dann aus den jeweiligen Kulturgefäßen entnommen und nach vorheriger Einbettung in ein Tissue-Freeze-Medium mittels Kryotom geschnitten. Nachdem die Präparate vollständig durchgefroren waren, erfolgte das Schneiden bei einer Kammertemperatur von – 25-30 °C und einer Objektträger Temperatur von ca. – 25 °C. Die Schnittdicken betrugen je nach Art des Präparats zwischen 10 und 40 µm. Während die Schnitte der verschiedenen *in vitro* –getesteten Knochenersatzmaterialien an der Universität Tübingen angefertigt wurden, wurden die *in vivo* getesteten Trägermaterialien durch das Medizinische Versorgungszentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik in Trier (Dr. Otto) geschnitten.

1.29 *In-vivo*-Testung: Großtierversuch am Schaf

Die folgende Beschreibung des Tierexperiments wurde in Auszügen wörtlich bzw. in abgewandelter Form aus dem Prüfplan der Fa. Freytox (Herzberg, Deutschland) übernommen. Die PILOT-Studie mit der Bezeichnung „Vergleichende Untersuchung der intraossären Biokompatibilität und Funktionalität von verschiedenen Knochenersatzmaterialien am Schaf“ wurde als NICHT-GLP- Studie durchgeführt. Ziel dieser Studie war die Untersuchung der intraossalen Gewebeintegration und lokaler Gewebeverträglichkeit von zwei verschiedenen Materialien der Fa. Aesculap AG. Hierbei soll vor allem die Eignung des neuentwickelten Polyurethan-Schaums gegenüber dem Referenzmaterial Osteovit® (klinisch zugelassenes Produkt) als Knochenersatzmaterial getestet werden. Der PU-Schaum wurde zum einen nativ d.h. in unbesiedeltem Zustand (Prüfgegenstand 1) und zum anderen mit individualisierten Stammzellen besiedelt (Prüfgegenstand 2) eingesetzt. Das Modelltier Schaf wurde aufgrund der bewährten Eignung für derartige Studien gewählt (Kandziora et al., 2001). Das Schafmodell wird zunehmend für die orthopädische Forschung verwendet, während es sich -im Zeitraum von 1980 bis 1989- bei nur etwa 5% der Versuchstiere für orthopädische Forschungen um Schafe handelte, wurde diese Tierart zwischen 1990 und 2001 mit zunehmender Tendenz (9-12%) für die orthopädische Forschung (Knochenbrüche, Osteoarthritis, Osteoporose etc.) eingesetzt (Martini, Fini, Giavaresi, & Giardino, 2001). Schafknochen besteht -ähnlich wie humaner Knochen- aus kortikalem Knochen und dem weniger dichten schwammartigen, spongiösem Knochen. Sowohl bei der Zusammensetzung der organischen wie auch der anorganischen Bestandteile des Knochens gibt es eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen humanem Knochen und Schafknochen

(Rehman, Smith, Hench, & Bonfield, 1995). Ravaglioli et al. untersuchten die mineralische Zusammensetzung der Knochen von Menschen, Rindern, Schafen und Hunden. Die Forschungsergebnisse zeigen, dass es kaum signifikante Unterschiede zwischen den Knochen der verschiedenen Spezies gibt (Ravaglioli et al., 1996). Weitere Vorteile für den Einsatz des Schafmodells sind das Menschen-ähnliche Körpergewicht sowie eine große Übereinstimmung der Knochenlänge – was für die Testung humaner Knochenimplantate von entscheidender Bedeutung ist (Newman, Turner, & Wark, 1995). In Kleintiermodellen wie etwa Maus, Ratte oder Kaninchen ist es nicht möglich Knochenimplantate (in der humanen Anwendungsgröße) zu testen. Auch im Schafmodell gibt es das sog. Bone-Remodelling (wie unter 1.3.5 beschrieben). Die PILOT-Studie wurde an insgesamt 5 Schafen durchgeführt. Zunächst wurde bei vier der fünf Versuchstiere Knochenmark entnommen. Von dem gewonnenen Zellmaterial wurde für jedes Schaf eine individualisierte Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen vorgenommen. Anschließend wurde der PU-Schaum (Prüfgegenstand 2) individuell für jedes Tier mit den eigenen mesenchymalen Stammzellen besiedelt. Da zwischen der Entnahme des Knochenmarksaspirats und dem Wiedereinsetzen des individuellen MSC-besiedelten Trägermaterials ein Zeitraum von 8 Wochen lag, wurden die Stammzellen in Passage 1 in flüssigem N₂ eingefroren. Erst 4 Tage vor dem Einsetzen in den Implantationssitus wurden die Zellen aufgetaut, in frisches Medium überführt und in individuell erforderlicher Zellzahl (je nach Wachstumsgeschwindigkeit, diese wurde zuvor in dem Versuchszeitraum anhand einer weiterpassagierten Parallelkultur getestet) ausgesät. Die Kultur der Zellen erfolgte für 3 Tage bei 37 °C, 5% CO₂. Zum Zeitpunkt des Ablösens besaßen alle angelegten individuellen MSC-Kulturen eine Konfluenz von 70-90%.

Bei vier von fünf Versuchstieren erfolgte die Implantation von nativem PU-Schaum und individuell mit MSC besiedeltem PU-Schaum in den Hüfthöcker (Tuber coxae). Beide Tuber coxae wurden als Implantationssitus genutzt. Bei einem Tier wurde der Referenzgegenstand Osteovit® eingesetzt (zellfrei, in beide Hüfthöcker). Der Implantationssitus wurde röntgenologisch über den gesamten Versuchszeitraum überwacht (siehe Tabelle 19).

Die erste planmäßige Explantation und makroskopische Evaluation des Implantationssitus erfolgte nach 12 Wochen post operationem (Studien zur Knochenregeneration am Schaf variieren in ihrer Dauer zw. 9- 24 Wochen (Petite H., 2000; Schell et al., 2008).

Die Fixierung des entnommenen Situs erfolgte in 4%- iger, gepufferter Formalinlösung für die weiterführenden histologischen Untersuchungen (Dr. Otto, Medizinisches Versorgungszentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik, Trier). Dieses Verfahren zur biologischen Prüfung von Medizinprodukten sowie deren Beurteilung in Bezug auf die biologische Verträglichkeit ist anerkannt (EN ISO 10993-6 / Ausgabe 2009-10).

1.29.1 Versuchstiere

Für das Tierexperiment wurden 5 weibliche Schafe der Rasse „Schwarzkopfschaf“ verwendet. Bei den Tieren handelte es sich um adulte Tiere (>1,5 Jahre) mit einem Gewicht von 40- 50 kg. Die Lebenserwartung von Schafen beträgt bis zu 15 Jahren (Kilborn, Trudel, & Uhthoff, 2002), bei den gewählten Versuchstieren handelte es sich um bereits ausgewachsene aber noch relativ junge Tiere mit hohem Potential zur Knochenregeneration. Studien belegen, dass mit zunehmendem Alter das

osteogene Heilungspotential stark zurückgeht (Lu et al., 2005). Um für den tierexperimentellen Versuch möglichst junge, potente Zellen zu verwenden wurden die MSC kurz nach ihrer Isolierung in flüssigem N₂ konserviert. Ein Teil der Zellen wurde weiter kultiviert um die Stammzellidentität der MSC in Differenzierungsversuchen bis zur Reimplantation auf den Trägern zu bestätigen. Nachfolgend wurde der PU-Schaum (Prüfgegenstand 2) mit den Stammzellen besiedelt. Die Besiedelung erfolgte individualisiert für jedes Tier. Für die besiedelten Prüfgegenstände wurde jeweils eine Gesamtzellzahl von 6 Millionen (je 3 Millionen auf der Ober- und Unterseite) individueller Stammzellen gewählt, da ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von Stammzellen zur Knochenneubildung besteht (Hernigou, Poignard, Beaujean, & Rouard, 2005). Das Schafmodell eignet sich insbesondere als Modell für die Heilung großer, segmentaler Knochendefekte da die Knochen hinsichtlich der Größe, Struktur und dem Regenerationspotential mit dem des Menschen vergleichbar sind (Nuss, Auer, Boos, & von Rechenberg, 2006). Die Vorteile der Verwendung eines standardisierten Tiermodells ergeben sich aus Sicht des Tierschutzes dahingehend, dass die Ergebnisse ggf. auf das humane Modell übertragen werden können ohne weitere Tierversuche durchführen zu müssen.

Es gibt auch andere etablierte Tiermodelle um die Knochenheilung zu untersuchen z.B. Kleintiermodelle u.a. Ratten oder Mäuse (Li et al., 1991 oder Einhorn et al., 1984) jedoch sind diese aufgrund des gänzlich unterschiedlichen Knochenaufbaus, der Knochengröße und auch aufgrund der unterschiedlichen Knochenheilung für den Bezug auf das humane Modell ungeeignet.

1.29.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Tabelle 16 veranschaulicht die Einteilung der Versuchstiere in zwei Gruppen (Prüfgegenstand PU-Schaum vs. Referenzgegenstand Osteovit). In Gruppe 1 erfolgte die Implantation von besiedelten und unbesiedeltem PU-Schaum abwechselnd in beide Tuber coxae.

Tabelle 16: Einteilung der Versuchstiere in 2 Gruppen (mit Änderungen übernommen aus dem Prüfplan der Fa. Freytox).

Gruppe (Polyurethanschaum) ¹	Linkes Tuber coxae	Rechtes Tuber coxae	Implantationsdauer
Tier Nr. 91709	PU-Schaum NATIV	PU-Schaum BESIEDELTE	12 Wochen
Tier Nr. 91745	PU-Schaum BESIEDELTE	PU-Schaum NATIV	21 Wochen
Tier Nr. 91702	PU-Schaum BESIEDELTE	PU-Schaum NATIV	30 Wochen
Tier Nr. 91758	PU-Schaum NATIV	PU-Schaum BESIEDELTE	39 Wochen
Gruppe 2 (Osteovit®)	Linkes Tuber coxae	Rechtes Tuber coxae	
Tier Nr. 91716	Osteovit® NATIV	Osteovit® NATIV	12 Wochen

1.29.3 Haltung und Versorgung der Versuchstiere

Die Haltung der Schafe erfolgte sowohl in der Akklimatisierungsphase wie auch im gesamten Studienzeitraum in Gruppenhaltung. Auf eine prinzipielle Einzelhaltung wurde aufgrund des ausgeprägten Herdeninstinkts dieser Tierart abgesehen. Individualisierte Rekonvaleszenzzeiten z.B. postoperative Aufwachphasen wurden dagegen gewährleistet. Als Einstreumittel wurde Stroh verwendet, welches täglich frisch und in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt wurde. Den Tieren wurde Trinkwasser (Trinkwasserqualität) sowie Heu (Raufutter) *ad libitum* bereitgestellt.

Die Knochenmarkentnahme, der operative Eingriff (Implantation des Referenz- bzw. Prüfgegenstandes) sowie die röntgenologische Überwachung wurden in Räumlichkeiten durchgeführt, die mit einer Luftfilterung ausgestattet waren. Die Lufttemperatur betrug 22 °C +/- 3 °C, die relative Luftfeuchtigkeit nicht weniger als 30% und vorzugsweise nicht mehr als 70%. Es erfolgte ein 10 maliger Luftwechsel pro Stunde (mit Änderungen entnommen aus dem Prüfplan der Fa. Freytox).

1.29.4 Zeitplan und Experimentelle Methodik des Tierversuchs

Zeitabschnitt 1, präoperative Vorbehandlung

Tabelle 17: Zeitabschnitt 1, präoperative Vorbehandlung (mit Änderungen übernommen aus dem Prüfplan der Fa. Freytox)

Tag -1	Versuchsvorbereitung	prophylaktische Antibiose (Start) Nüchterung
Tag 0	Knochenmarkaspiration	Versand des Knochenmarkspirats an das IKET
Woche 4-6	Rekonvaleszenz	Wundheilung MSC Isolierung, Expansion und Charakterisierung am IKET Versand der besiedelten Prüfgegenstände an FREY-TOX GmbH durch das IKET

Zeitabschnitt 2, operativer Eingriff

Aus den Knochenmarkaspiraten der einzelnen Versuchstiere wurden zunächst die MSC isoliert, charakterisiert und expandiert.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Kulturmediums für den Tierversuch.

Alpha-MEM- Medium
20% FCS
1% Penicillin/ Streptomycin

Die Charakterisierung der MSC beinhaltete die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung. Hierfür wurde eine Parallelkultur für jedes Tier angelegt (während die MSCs für den Tierversuch in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden). Die Charakterisierung der MSC diente der Bestätigung der Stammzell-Identität vor der Re-Implantation der Zellen in die Tuber coxae der Versuchstiere.

Tabelle 19: Zeitabschnitt 2, operativer Eingriff (mit Änderungen übernommen aus dem Prüfplan der Fa. Freytox)

Tag -1	Versuchsvorbereitung	prophylaktische Antibiose (Start) Nüchterung
Tag 0	Röntgenologische Nativaufnahme Operation Röntgenologische Kontrollaufnahme	2 Ebenen 2 Ebenen
Tag 14	Röntgenologische Kontrollaufnahme	2 Ebenen
Tag 35	Röntgenologische Kontrollaufnahme	2 Ebenen
Tag 63	Röntgenologische Kontrollaufnahme	2 Ebenen
Tag 82	Röntgenologische Kontrollaufnahme Sektion Gruppe Osteovit® Sektion Gruppe PU-Schaum	2 Ebenen Beurteilung des umliegenden Gewebes und Entnahme des Tuber coxae

1.29.5 Experimentelle Methodik des Tierversuchs

Im Folgenden werden die verwendeten Methoden für das Tierexperiment vorgestellt.

1.29.5.1 Knochenmarkaspiration

Die Entnahme des Knochenmarks erfolgte unter Nutzung des rechten Tuber coxae, nur bei einem Tier (Nr. 91709) wurde der Zugang zur Knochenmarkentnahme über das linke Tuber coxae gewählt (mit Änderungen entnommen aus dem Prüfplan der Fa. Freytox). Das aspirierte Knochenmark (Fa.Freytox, Herzberg) wurde sofort nach

der Entnahme in Isolierungsmedium überführt. Das zugesetzte Heparin verhinderte dabei die Gerinnung der Knochenmarksproben bis zur Weiterverarbeitung des Materials in Tübingen (Institut für Klinische und Experimentelle Transfusion). Der Probentransport erfolgte gekühlt innerhalb einer Zeitspanne von 8- 15 Stunden.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Isolierungsmediums.

Alpha-MEM- Medium
20% FCS
1% Penicillin/ Streptomycin
2 500 I.E. Heparin

Bis zur Verwendung wurde das Isolierungsmedium bei 4°C gelagert. Vor der Anwendung wurde das Medium äquilibriert (2 h bei 37 °C / 5% CO₂) hierfür wurden die Deckel der Gefäße leicht angedreht.

Tabelle 21: Methodik der Knochenmarkaspiration (entnommen aus dem Prüfplan der Fa. Freytox GmbH).

Tag -1	Futterentzug (Nüchterung mind. 18 Stunden <i>prae operationem</i>). Start der antibiotischen Prophylaxe mit 75 mg/kg KM (Körpermasse) Sulfamethoxypyridazin (s.c.)
Tag 0	Äquilibration des Isolationsmediums Sedation unter Verwendung von 0,2 bis 0,5 mg/kg KM Diazepam (i.m.) Rasur, Reinigung und Desinfektion des Hüfthöckers Sterile Abdeckung des Hautsitus Lokale Infiltrationsanästhesie Lidocain 2% Hautinzision, Knochenmarkaspiration unter Verwendung einer Jamshidi-Nadel Verschluss der Hautwunde Fortsetzung der antibiotischen Prophylaxe 50 mg/kg KM Sulfamethoxypyridazin (s.c.) Tagfertiger Direktversand der Knochenmarkaspirate (same-day) an das IKET (gekühlt) für die Stammzellisolation.
Tag 1	Fortsetzung der antibiotischen Prophylaxe 50 mg/kg KM Sulfamethoxypyridazin (s.c.)
Tag 2	Abschluss der antibiotischen Prophylaxe, finale Applikation von 50 mg/kg KM Sulfamethoxypyridazin (s.c.), klinischen Bewertung der Wundheilung

1.29.5.2 Operation

Tabelle 22: Methodik Operatives Management (entnommen aus dem Prüfplan der Fa. Freytox GmbH).

Tag -1	<p>Futterentzug (Nüchterung mind. 18 Stunden <i>prae operationem</i>)</p> <p>Start der antibiotischen Prophylaxe mit 75 mg/kg KM Sulfamethoxypyridazin (s.c.)</p>
Tag 0	<p>Vorbereitungen</p> <p>Sedation unter Verwendung von 0,2 bis 0,4 mg/kg KM Diazepam (i.m.)</p> <p>Legen eines Venenkatheters, Infusionstherapie NaCl 0,9%</p> <p>Einleitung der Allgemeinanästhesie 2 mg/kg KM Ketamin mit 0,02 mg/kg KM Diazepam (i.v.), Intubation und Erhaltung der Allgemeinanästhesie durch Inhalationsnarkose (Isofluran)</p> <p>Perioperative Analgesie 0,4 mg/kg KM Butorphanol (s.c.)</p> <p>Fortsetzung der antibiotischen Prophylaxe mit 50 mg/kg KM Sulfamethoxypyridazin (s.c.)</p> <p>Rasur und Reinigung des dorsalen Beckenbereichs</p> <p>Anfertigung der nativen Röntgenaufnahmen (2 Ebenen)</p> <p>Operation</p> <p>Desinfektion und sterile Abdeckung des Beckenbereichs</p> <p>Hautinzision und Freilegen des Tuber coxae (beidseits)</p> <p>Minimalinvasives, lokales Freilegen der Ala ossis ilii (dorsal Facies glutea, ventral Facies sacropelvina) für transkortikale Abschlussfixierung</p> <p>Präparation des Implantatbettes innerhalb des Tuber coxae unter Nutzung einer Schablone (Form des Prüfgegenstandes), intraossale Lokalisation des Implantationsbettes</p> <p>Einbringen des spezifizierten Implantates.</p> <p>Gruppe 1 (PU-Schaum)</p> <p>Prüfgegenstand 1, nativer PU-Schaum versus</p> <p>Prüfgegenstand 2, besiedelter PU-Schaum</p> <p>Alternierende Nutzung linkes versus rechtes Tuber coxae</p> <p>Dokumentation der individuellen Prüfmuster</p> <p>Gruppe 2 (Osteovit®), nicht zellbesiedelt</p> <p>Zuschnitt des Referenzgegenstandes analog zur Form des PU-Schaums</p> <p>Nutzung des linken und rechten Tuber coxae für Implantation</p> <p>Transkortikale Fixierung des Implantates durch Platzierung eines U-Heftes (Polypropylen USP 5/0) unter Einbezug des Implantates.</p> <p>Verschluss der Hautwunde</p> <p>Postoperative Röntgenkontrolle (2 Ebenen)</p> <p>Postoperative Analgesie 0,005 mg/kg KM Buprenorphin (s.c.)</p>

Die besiedelten Prüfgegenstände (mit 6 Millionen Stammzellen des jeweiligen Tieres) wurden bis zum Einsetzen in den Situs in Kulturmedium im Brutschrank gelagert (37 °C, 5% CO₂, angedrehter Deckel). Die Lagerung der Prüfgegenstände erfolgte maximal 4 Tage bis zur Operation. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Medienwechsel durch sterile Überführung des besiedelten Prüfgegenstandes in ein Gefäß mit frischem, vorgewärmtem Kulturmedium. Pro Tier wurden 3 besiedelte Prüfgegenstände bereitgestellt (mit den individuellen MSC des jeweiligen Tieres), die Anzahl war bestimmt durch die operative Verwendung, Ersatz und Kontrollevaluierung der individuellen Besiedelung der Prüfgegenstände zum Zeitpunkt der Implantation.

1.29.6 Postoperatives Management

Die postoperative Beobachtung der Schafe bezüglich Allgemeinbefinden und Wundheilung erfolgte täglich. Jede Abweichung vom Physiologischen bezüglich Eintritt, Dauer und Intensität wurde dokumentiert.

Die antibiotische Therapie wurde planmäßig bis einschließlich Tag 2 post operationem durchgeführt (50 mg/kg KM Sulfamethoxypyridazin (s.c.)). Die analgetische Betreuung wurde am Tag 1 und 2 post operationem durch die Gabe von 0,005 mg/kg KM Buprenorphin (s.c.) in einem Intervall von 12 Stunden gesichert. Eine weiterführende analgetische und/ oder antibiotische Betreuung erfolgte entsprechend der klinischen Bewertung der Tiere (verändert aus dem Prüfplan der Fa. Freytox GmbH).

Vor der Implantation erfolgte eine 2-fache Waschung der besiedelten Prüfgegenstände in PBS-Lösung (37°C) für je 5 bis 10 Minuten um Rückstände des

Kulturmediums bzw. der darin enthaltenen bovinen Proteine zu entfernen (zur Vermeidung allergischer Reaktionen).

1.29.7 Röntgenologische Kontrolluntersuchungen

Die röntgenologischen Untersuchungen der Versuchstiere wurden stets unter Allgemeinanästhesie (Inhalationsnarkose) durchgeführt, um eine adäquate Lagerung der Tiere zu gewährleisten. Beide Hüftböcker (Tuber coxae) wurden in den Projektionsrichtungen dorsoventral (d/v) sowie laterolateral (l/l) untersucht, wobei auf eine gute Sichtbarkeit des Implantationssitus geachtet wurde (verändert nach dem Prüfplan der Fa. Freytox GmbH).

1.29.8 Sektion

Die Tiere wurden zunächst mit 0,4 mg/kg KM Diazepam (i.m.) sediert und nachfolgend wurde eine Allgemeinnarkose eingeleitet (10 mg/kg Ketamin (i.m.)) welche ggf. mit 2 mg/kg KM Ketamin und 0,02 mg/kg KM Diazepam (i.m.) vertieft wurde. Nachfolgend wurden die Tiere unter Allgemeinanästhesie schmerzlos getötet (T61, intravenös). Nach der makroskopischen Befundung und Probenmaterialgewinnung wurden die Tiere entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen entsorgt (verändert nach dem Prüfplan der Fa. Freytox GmbH).

1.29.9 Makroskopische Befunde / Histologie

Es erfolgte eine makroskopische Beurteilung der Wundheilung am Implantationsbett der Prüf- bzw. Referenzgegenstände sowie des umliegenden Gewebes. Ferner wurde die Gewebeintegration der Prüfgegenstände untersucht und alle pathologischen Befunde dokumentiert.

1.29.10 Histologische Auswertung

Nach der makroskopischen Befundung wurden der Implantationssitus des Referenz- bzw. Prüfgegenstandes vollständig und intakt aus dem Darmbein (Os ileum) entnommen. Die Proben wurden in 4%-iger gepufferter Formalinlösung fixiert und für die weiterführende histologische Untersuchung an das Medizinische Versorgungszentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik in Trier (Dr. Otto) verschickt.

1.30 Mikroarray

1.30.1 Screening nach hMSC-Populationen mit hohem osteogenem Potential

Für die Quantifizierung der Osteogenese wurden insgesamt 20 humane MSC-Populationen unter hypoxischen Versuchsbedingungen (37°C, 5% O₂) in gleicher Zelldichte von 1100 Z/cm² in Kulturflaschen ausgesät. Die hypoxischen Versuchsbedingungen wurden bewusst gewählt um das natürliche Umgebungsmilieu mesenchymaler Stammzellen zu imitieren. So liegt im Knochenmark ebenfalls ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck vor. Verschiedene Forschungsgruppen berichten zudem, dass Hypoxie ein genetisches Programm aktiviert, welches den multipotenten Status der MSC bewahrt (Basciano et al., 2011). Nach einer Wachstumsphase von 8 Tagen erreichten alle Zellpopulationen eine Konfluenz von 75-90% . Es folgte die Ablösung der Zellen mittels Trypsin (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L Versene®) und eine Neuaussaat in 6-Well Platten (150.000 Zellen pro Well). Dies entspricht einer Zelldichte von 15 000 Zellen pro cm² (diese Zelldichte wurde aus dem Mittelwert von 55 humanen MSC Populationen ermittelt, die bei einer Dichte von 80% abgelöst wurden). Die Proben wurden abhängig von der jeweiligen Zellausgangsmenge des entsprechenden Spenders in 4- bis 6-fach Replikaten getestet . Nach 3 Tagen wurde die Hälfte der Proben osteogen differenziert (Zusatz von osteogenem Differenzierungsmedium mit AB-Serum), der andere Teil wurde weiter in Wachstumsmedium (Alpha-MEM + 10% AB-Serum) kultiviert (Negativkontrolle). Im Anschluss an den 21-tägigen Inkubationszeitraum wurde eine Alizarinrotquantifizierung durchgeführt (Gregory et al., 2004). Der Alizarinrotfarbstoff

bindet dabei an den bei der osteogenen Differenzierung gebildeten Matrixbestandteil Kalzium. Bei der Methode nach Gregory et al. wird nach dem Anfärben der Probenmatrices der Alizarinrot- Farbstoff durch eine Essigsäure- Extraktion wieder aus den angefärbten mineralischen Matrices gelöst um dann die Extinktion des gelösten Farbstoffs photometrisch bei 405 nm zu bestimmen.

1.30.2 Versuchsaufbau Mikroarray

Für das Mikroarray-Experiment (Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray) wurden aus den 20 von verschiedenen Spendern isolierten MSC-Populationen, zunächst diejenigen fünf MSC-Populationen selektiert, die *in vitro* das höchste osteogene Potential zeigten (siehe Tabelle 45). Diese 5 MSC Populationen wurden unter 4 verschiedenen Parametern kultiviert und dann im Mikroarray-Experiment auf Veränderungen in der Genexpression untersucht: osteogen differenzierte vs. undifferenzierte Zellen und 2- dimensionale (2D) Kultur (Kulturflasche) vs. 3- dimensionale (3D) Kultur (auf Scaffold PU-Schaum).

Tabelle 23: Übersicht der Mikroarray- Proben

2D	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 113</i>
	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 134</i>
	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 151</i>
	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 156</i>
	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 162</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 113</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 134</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 151</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 156</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 162</i>
3D	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 113</i>
	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 134</i>
	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 151</i>
	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 156</i>
	<i>osteogen differenzierte MSC- Spender 162</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 113</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 134</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 151</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 156</i>
	<i>undifferenzierte MSC- Spender 162</i>
POOL	<i>2 D osteogen differenziert Pool (5 Spender)</i>
	<i>2 D undifferenziert Pool (5 Spender)</i>
	<i>3 D osteogen differenziert Pool (5 Spender)</i>
	<i>3 D undifferenziert Pool (5 Spender)</i>

Für das Mikorarrayexperiment wurden alle MSCs in der zweiten Passage verwendet. Die Zellen für die 2D-Kultur wurden in einer Dichte von 1500 Zellen/cm² in Kulturflaschen ausgesät, für die 3D-Kultur wurden die Polyurethanscaffolds beidseitig mit jeweils 250 000 Zellen/cm² besiedelt (pro Schaum 500 000 Zellen). Nach Beendigung des 21-tägigen Inkubationszeitraums wurden die Kulturflaschen bzw. die Scaffolds mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend erfolgte die Extraktion der RNA mittels Trizol. Die RNA- Proben wurden auf ihre Qualität (RIN-Werte zwischen 8 und 9,4) und Quantität überprüft. Nachdem die eingereichten Proben eine gute RNA-Qualität aufwiesen erfolgte die Amplifikation und der Einbau des Cy3-Farbstoffs in die RNA-Proben (Fa. Miltenyi Biotec). Die RNA-Ausbeute und die Rate des Farbstoff-Einbaus wurden durch das ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies) gemessen.

1.30.3 Einfluss der Oberfläche auf die osteogene Differenzierung

Die Analyse der Mikroarray-Proben (siehe Tabelle 23) sollte Aufschluss über den Einfluss der Kulturoberfläche auf die osteogene Differenzierung geben. So sollte geklärt werden in wie weit die Genregulation bei der 3 dimensional Kultur verändert wird und ob zusätzliche Signalwege induziert werden bzw. welche Signalwege bei der jeweiligen Kulturmethode (2D bzw. 3D) eine Rolle spielen.

1.30.4 **Evaluierung der Genregulation der osteogen differenzierten Zellen im Vgl. zur undifferenzierten Negativkontrolle**

Die Mikroarray-Proben sollten außerdem Aufschluss geben über die Gene, die während des osteogenen Differenzierungsprozesses bzw. bei den undifferenzierten Kontrollen hoch- bzw. herunterreguliert wurden. Ferner sollte geprüft werden, welche Signalwege bei den osteogen induzierten Proben im Vgl. zu den undifferenzierten Proben aktiviert wurden.

Tabelle 24: Darstellung der Ratio-Experimente

h113_undiff_2D_vs_h113_osteo_2D	h113_undiff_3D_vs_h113_osteo_3D
h134_undiff_2D_vs_h134_osteo_2D	h134_undiff_3D_vs_h134_osteo_3D
h151_undiff_2D_vs_h151_osteo_2D	h151_undiff_3D_vs_h151_osteo_3D
h156_undiff_2D_vs_h156_osteo_2D	h156_undiff_3D_vs_h156_osteo_3D
h162_undiff_2D_vs_h162_osteo_2D	h162_undiff_3D_vs_h162_osteo_3D
h113_undiff_2D_vs_h113_undiff_3D	h113_osteo_2D_vs_h113_osteo_3D
h134_undiff_2D_vs_h134_undiff_3D	h134_osteo_2D_vs_h134_osteo_3D
h151_undiff_2D_vs_h151_undiff_3D	h151_osteo_2D_vs_h151_osteo_3D
h156_undiff_2D_vs_h156_undiff_3D	h156_osteo_2D_vs_h156_osteo_3D
h162_undiff_2D_vs_h162_undiff_3D	h162_osteo_2D_vs_h162_osteo_3D
pool_undiff_2D_vs_pool_osteo_2D	pool_undiff_2D_vs_pool_undiff_3D
pool_undiff_3D_vs_pool_osteo_3D	pool_osteo_2D_vs_pool_osteo_3D

Ergebnisse

1.31 Selektion von hMSC-Subpopulationen mit hohem osteogenem Potential

Wie unter 1.15.2 beschrieben sollten bestimmte Oberflächenmarker, welche laut Literatur in Zusammenhang mit einer hohen Pluripotenz von MSC stehen, für 20 verschiedene MSC Populationen bestimmt werden. Die Pluripotenzmarker GD2, SSEA-4, W8B2 oder CD146 sollten in den Experimenten bei gut bzw. schlecht osteogen differenzierenden humanen MSC-Populationen mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Die Fragestellung sollte geklärt werden, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Qualität der osteogenen Differenzierung und der Anwesenheit der genannten Oberflächenmarker besteht.

Zunächst wurden wie unter 1.15.1 (Bestimmung des osteogenen Potentials von MSC) beschrieben, hMSC kultiviert und nach Erreichen der Subkonfluenz osteogen induziert. Nach einem 21 – tägigen Differenzierungszeitraum wurden die Zellen fixiert und mittels Alizarinrot-Farbstoff nach Protokoll (Gregory et al., 2004) angefärbt. Die Abschätzung des prozentualen Anteils osteogen differenzierter Zellen nach der Alizarinrot-Anfärbung führte zu folgenden Werten, welche in Abbildung 14 dargestellt wurden.

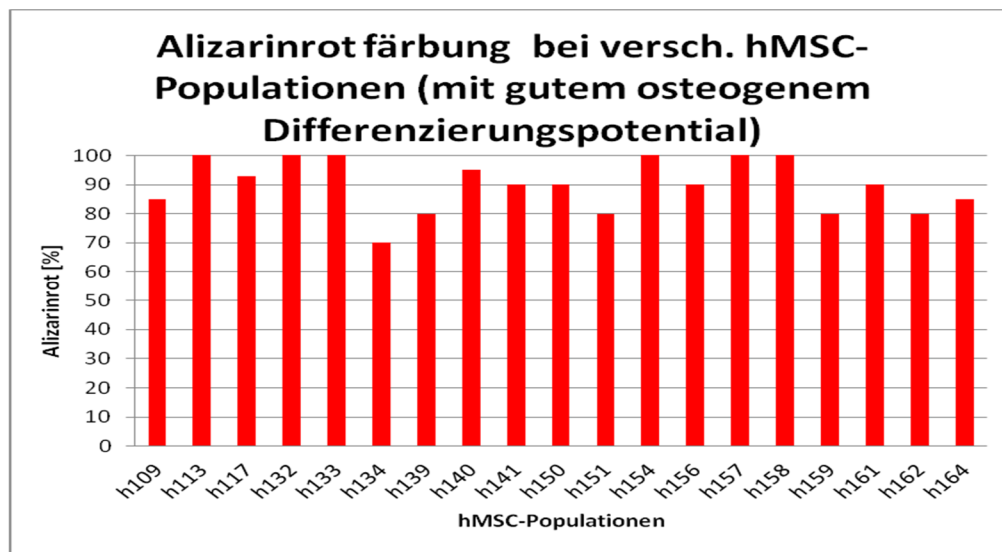


Abbildung 14: Übersicht der hMSC-Populationen mit hohem osteogenem Differenzierungspotential.

Zunächst wurden alle hMSC-Populationen dargestellt, welche eine sehr hohe prozentuale Positivität zeigen. Insgesamt wurden 19 Populationen bestimmt, deren prozentuale Positivität >70% war. Nun wurden mittels FACS die vier Pluripotenzmarker W8B2, GD2, CD146 sowie SSEA-4 auf den jeweiligen Population bestimmt und in den nachfolgenden Diagrammen dargestellt. Der Oberflächenmarker MSCA-1 (=W8B2) zeigte sich bereits bei Stammzellen aus dem Periost als vielversprechender osteogener Oberflächenmarker (Alexander et al., 2010). Der Oberflächenmarker CD146 wird abhängig vom Ursprungsort der MSC exprimiert z.B. findet man eine höhere Expression dieses Oberflächenmarkers auf MSC welche aus der Plazenta stammen als bei MSC die aus dem Knochenmark stammen. Experimentelle Daten von Pilz et al. zeigen, dass die osteogene Differenzierung mit der Expression dieses Oberflächenmarkers korreliert (Pilz et al., 2011).



Abbildung 15: Übersicht der prozentualen Positivität der Oberflächenmarker W8B2, GD2, CD146 und SSEA-4 bei *in vitro* sehr gut osteogen differenzierenden hMSC.

Anhand der abgebildeten Ergebnisse der Expression der 4 Pluripotenzmarker (Abbildung 15) kann keine Korrelation zwischen der Güte der osteogenen Differenzierung der Zellen (alle sehr gut mit > 70%) und der Expression der getesteten Oberflächenmarker gemacht werden. Die Verteilung der Oberflächenmarker ist bei den getesteten MSC-Populationen sehr unterschiedlich. Es gibt jeweils Populationen mit hohem osteogenen Differenzierungspotential die den individuellen Marker niedriger bzw. auch höher exprimieren. Lediglich beim Oberflächenmarker W8B2 kann eine hohe Übereinstimmung der osteogenen Potenz mit der Expression des Markers festgestellt werden. 2 Populationen h109 und h151 exprimieren diesen Oberflächenmarker jedoch nur relativ schwach (40- 52% positive Zellen), diese Populationen zeigen aber eine sehr hohe osteogene Potenz (auch in der qualitativen Alizarinrotanalyse vgl. Abbildung 128). Nur 5 Populationen zeigten

ein relativ schwaches osteogenes Differenzierungspotential. Diese Populationen, die nur eine prozentuale Positivität von < 50% erreichten werden in Abbildung 16 dargestellt.

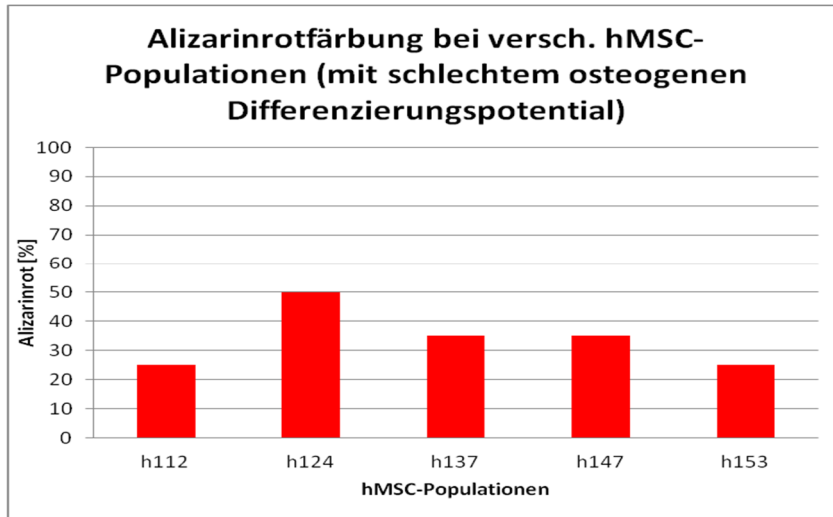


Abbildung 16: Übersicht der hMSC-Populationen mit schwachem osteogenem Differenzierungspotential.



Abbildung 17: Übersicht der prozentualen Positivität der Oberflächenmarker W8B2, GD2, CD146 und SSEA-4 bei *in vitro* sehr schlecht osteogen differenzierenden hMSC.

Auch hier wurde um Aussagen über eine Korrelation der exprimierten Oberflächenmarkern zum osteogenem Potential der Populationen eine Übersicht der FACS Daten (siehe Abbildung 17) zusammengestellt. Anhand der abgebildeten Ergebnisse der Expression der getesteten Pluripotenzmarker (Abbildung 15) kann auch in diesem Fall keine Korrelation zwischen der Güte der osteogenen Differenzierung der Zellen (alle sehr schwaches osteogenes Differenzierungspotential <50%) und der Expression der getesteten Oberflächenmarker gemacht werden. Nach einer Veröffentlichung von Wang et al. zeigen Nierenzellen ein unterschiedliches Expressionsmuster von CD146- abhängig von der Glukosekonzentration der *in vitro* kultivierten Zellen (Wang et al., 2008). Experimente mit MSC in High- bzw. normalem Glukosemedium zeigten jedoch keine Veränderung des Oberflächenmarkers CD146 (Daten nicht gezeigt). Es konnte aber eine Korrelation der Expression von CD146 und der Zelldichte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18).

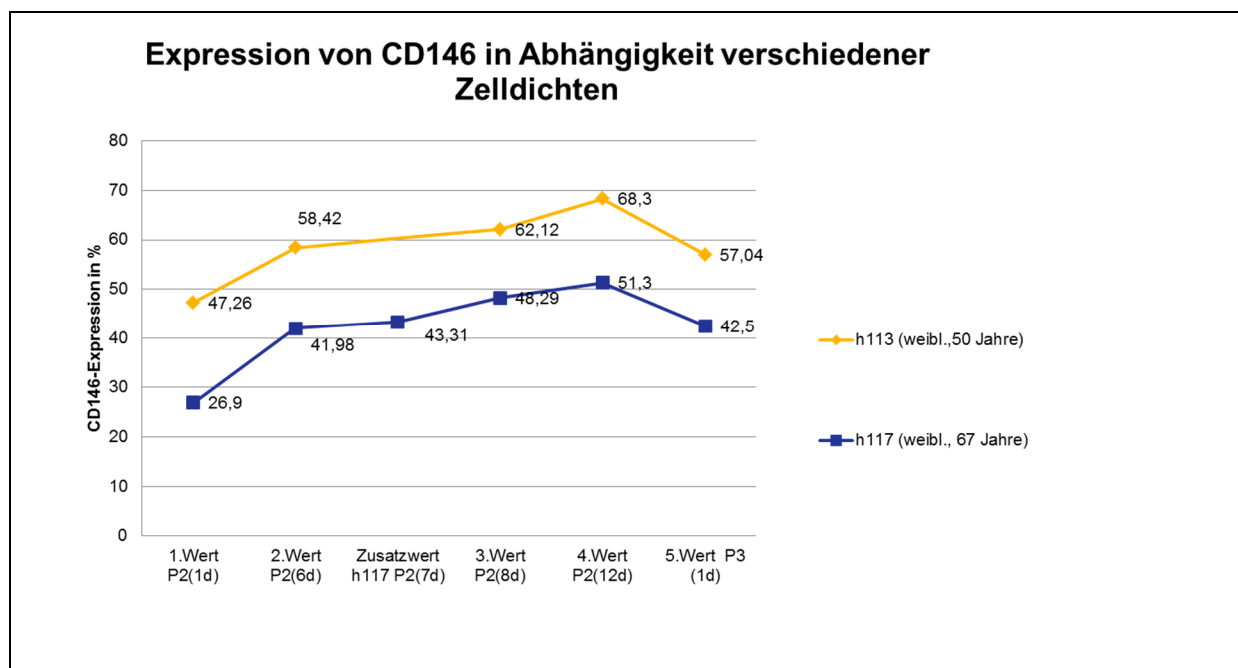


Abbildung 18: Expression des Oberflächenmarkers CD146 in Abhängigkeit verschiedener Zelldichten (2 hMSC-Populationen). Gezeigt wird der Anteil CD146 positiver Zellen.

hMSC von zwei verschiedenen Spendern wurden in Standardkulturmedium in einer Ausgangszelldichte von 1000 Zellen / cm² ausgesät und über einen Inkubationszeitraum von 12 Tagen kultiviert (5 Kulturflaschen pro Spender). Nach verschiedenen Zeitpunkten (und damit auch mit verschiedenen Zelldichten) wurden die Zellen abgelöst und auf ihre CD146- Expression mittels FACS untersucht. Nach 12 Tagen wurden die Zellen abgelöst und eine Neuaussaat mit 1000 Zellen/cm² durchgeführt. Während eine Zunahme des Oberflächenmarkers analog mit der Zunahme der Zelldichte beobachtet werden kann, findet nach der Neuaussaat bei geringer Zelldichte bei beiden Stammzellpopulationen eine Reduktion der Expression von CD146 statt. Weitere Experimente müssen durchgeführt werden um diese Beobachtung zu stützen.

Allgemein kann eine wichtige Aussage über das osteogene Potential der Populationen und dem Wachstumsverhalten *in vitro* gemacht werden. Die hMSC-Populationen, denen ein gutes osteogenes Potential nachgewiesen werden konnten, zeigten *in vitro* insgesamt ein sehr gutes Proliferationsverhalten. Im Umkehrschluss konnte bei den 5 Populationen, die durch ein schlechtes osteogenes Potential auffielen, ein sehr schlechtes Wachstumsverhalten beobachtet werden (Einzelzellen, lösen sich ab, sehr langsames Wachstum).

1.32 Selektion GMP-konformer Kulturmedien ohne FCS-Zusatz

Wie unter 1.8 (Expansion von hMSC in verschiedenen GMP-grade Medien) beschrieben, sollten verschiedene GMP-konforme Medien auf ihre Eignung zur Kultur mesenchymaler Stammzellen geprüft werden. Für dieses Experiment wurden humane MSC von drei verschiedenen Spender gewählt und über einen Zeitraum von 11 Tagen in verschiedenen Medien kultiviert. Nach 1, 4, 8 und 11 Tagen wurde ein Promega-CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay durchgeführt. In Abbildung 19 wurden die Absorptionswerte (bei 490 nm) nach 11 Tagen aufgetragen. Das als Standardkulturmedium gewählte Alpha-MEM + 10% AB-Serum zeigte bei allen Populationen den höchsten OD-Wert und damit die höchste Vitalität der Zellen. Aber auch das Medium mit 5% Plättchenlysate + 5 g/L Albumin zeigte sehr gute Vitalitätsergebnisse. Die Verringerung der PL-Konzentration auf 2% geht mit einer Reduktion der Zellvitalität einher. Auch nach 1, 4 und 8 Tagen wurden ein Promega-CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay durchgeführt (Daten nicht gezeigt) – hier sind die Unterschiede jedoch nicht so deutlich sichtbar wie nach 11 Tagen Kulturdauer.

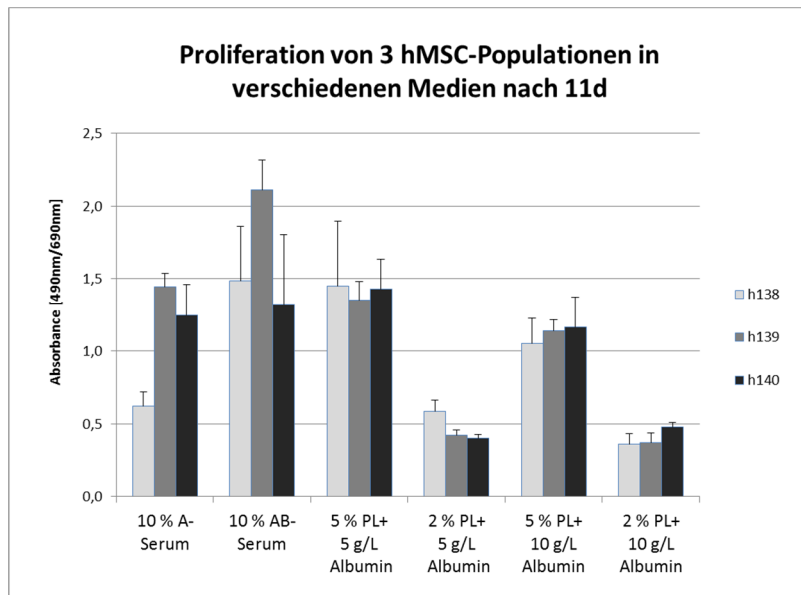


Abbildung 19: Übersicht der Ergebnisse des Zellvitalitätsassays von 3 verschiedenen hMSC Populationen nach 11 Tagen (n=4).

Da die Medien mit 2% Plättchenlysat sowie das Medium mit A-Serum Zusatz sehr viel schlechter im Promega-CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay abgeschnitten haben, wurden diese Medien nicht weiter geprüft. Von den übrigen Medien wurden Differenzierungsexperimente durchgeführt und die Daten mit dem Standardkulturmedium (Alpha-MEM+ 10% AB-Serum) verglichen. Die osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierungseigenschaften der drei getesteten MSC-Populationen waren bei allen Testmedien ähnlich. Der Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an humaner Albuminlösung verbesserte die Differenzierungsergebnisse der drei Testpopulationen nicht. Wurden die drei humanen MSC-Populationen in Medium mit 5%- Plättchenlysat kultiviert (ohne Albuminzusatz) zeigen sich analoge adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungsergebnisse wie bei den beiden Proben mit 5 bzw. 10 g/L Albuminzusatz (Daten nicht gezeigt).

1.33 Bioreaktor

1.33.1 Exemplarische Darstellung eines Reaktorlaufs mit MSC- Zellen von Spender 113, Passage 3

Zeit	Maßnahme/ Bemerkung
-1 Woche	Scheibenbett zusammengesetzt: Horizontales Scheibenbett mit 0,8 mm Abstand zw. den Scheiben (in EtOH sterilisiert), 54601 cm ² Gesamtfläche.
	Reaktorzusammenbau/ Verschlauchung (Vitonschläuche)
	Scheibenbett unter der Sterilwerkbank in den Reaktor eingesetzt
	Kalibrierung/ Sterilisierung der Elektroden (pO ₂ gegen H ₂ O-gesättigte Luft)
	Einbau des Reaktors in den Breeder und Einbau der Elektroden
	Beginn des Sterillaufs
	Begasung mit CO ₂ (4,2 ml/min), N ₂ (30 ml/min) und Luft (10 ml/min) kontinuierlich
	Sterillauf mit 0,5% AB-Serum im Alpha MEM Medium
	Ende Sterillauf (insgesamt über einen Zeitraum von 6 Tagen)
Tag 1	1. Besiedlung mit $3,9 \times 10^6$ Zellen in 330ml Medium (Oberseite Scheiben) (Spender h113 , P3)
	2. Besiedlung mit $8,0 \times 10^5$ Zellen in 330ml Medium (nach 180° Drehung 2. Besiedlungsseite)
	Start der Kultivierung
	Reaktor rotieren lassen, um eine gute Durchmischung für die Probenahme zu erzielen
	Einstellungen: Zirkulation: 3,0 ml/min, Rotation: 1rpm
	Begasung mit CO ₂ auf 4 ml/min umgestellt, N ₂ (30 ml/min) und Luft (10 ml/min) ins Overlay
	Fütterung mit frischem Kulturmedium: 4 ml/min, 5% intermittierend = 86 ml/d.
	Änderung der Begasung wegen starker Blasenbildung :Luftzufuhr auf 5 ml/min
Tag 4	Änderung der Begasung wegen starker Blasenbildung im Reaktor: neu N ₂ 20 ml/min, Luft 3,3 ml/min, CO ₂ 2,7 ml/min (vorher 30/5/4)
7:50 Uhr	Fütterung mit frischem Kulturmedium: 6 ml/min, 8% intermittierend = 207 ml/d.
12:43 Uhr	Nach Glukosemessung erneute Umstellung der Fütterungsrate: Fütterung mit frischem Kulturmedium: 8 ml/min, 9% intermittierend = 310,4 ml/d.
Tag 6	Frisches Kulturmedium
	Änderung der Begasung wegen zu niedrigen pH-Wert -> neu CO ₂ 3,4 ml/min, N ₂ 30ml/min
	Nach Glukosemessung (niedrig) erneute Umstellung der Fütterungsrate Fütterung mit frischem Kulturmedium: 9 ml/min, 10% intermittierend = 388,0 ml/d.
Tag 7	Fütterungsrate vom Vortag fortgeführt
Tag 8	Reaktorlauf beendet:
	Ablösen der Zellen mit Kollagenase-Lsg. 200 U/ml ca. 1 ¼ h

Ergebnis:

Tabelle 25: Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen (CASY Cell Counter TT, Roche) aller drei Reaktorläufe.

Reaktorlauf Nr.	Anfangszellzahl	Vitale Zellen	Dauer des Reaktorlaufs [d]
1.) Spender 113	8 x10 ⁶	88,5x10 ⁶	7
2.) Spender 117	9 x10 ⁶	103,0 x10 ⁶	13
3.) Spender 133	25 x10 ⁶	114,5x10 ⁶	8

Die Zellen wurden nach dem Bioreaktorlauf eingefroren. Exemplarisch wurde für Spender 133 gezeigt, dass die Zellen nach dem Reaktorlauf noch in der Lage sind adipogen, osteogen und chondrogen zu differenzieren (d.h. sie behalten ihre Stammzellpotenz). Die Ergebnisse des Differenzierungsversuchs zeigen einheitliche Ergebnisse zu Differenzierungsexperimenten des gleichen Spenders in der 2D-Zellkultur (Inkubator, 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂).

1.34 ECFC-Isolierung aus Leukaphereseprodukten (Kegel/ Beutel) bzw. aus Vollblut

Umfassende Anstrengungen die ECFC-Zellen aus Vollblut zu isolieren sind leider gescheitert (n=3). Hier konnte auch mehrere Wochen nach der Isolierung kein Zellwachstum in den Zellkulturflaschen beobachtet werden. Die Isolierung der ECFC-Zellen aus Leukapheresekegeln (n=10) führte nur in 20% der Fälle zu einem Wachstum von Zellen. Hier konnte aber beobachtet werden, dass die isolierten Zellen eine heterogene Morphologie aufwiesen. Es gab unterschiedliche Populationen. Die Isolierung der seltenen ECFC-Zellpopulation aus Leukapheresbeuteln gelang hingegen (n=22) in 15 Fällen. Die isolierten Zellen

bildeten spenderabhängig nach 7- 21 Tagen Kolonien. Die Morphologie dieser Kolonien entsprach dem für ECFC beschriebenen „kopfsteinpflasterartig“ Typus (siehe Abbildung 20).

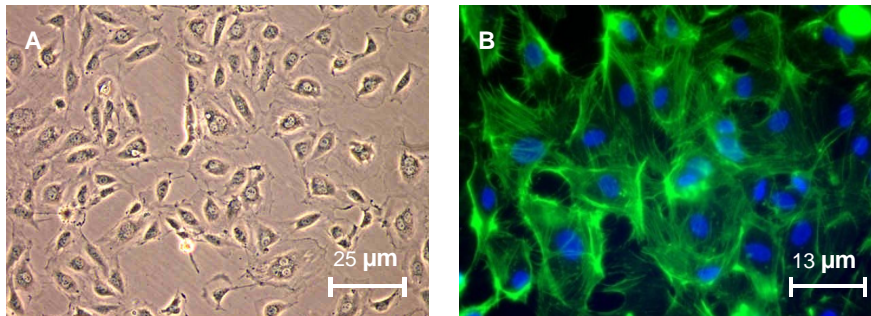


Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen einer ECFC -Kultur bei 100-facher Vergrößerung. A: Durchlichtaufnahme B: Phalloidin/DAPI-Überlagerung.

1.35 Bestimmung der ECFC-Identität der isolierten Zellen

Sowohl die beiden Isolate aus Leukapherese-Kegeln wie auch die isolierten Zellpopulationen aus den Leukapheresebeuteln wurden wie unter 1.15.5 (Bestimmung des Angiogenesepotentials von EPCs mittels Tubeformation-Assay) und 1.15.6 (DIL-Ac-LDL-Uptake) beschrieben charakterisiert. Zum Vergleich wurden HUVEC-Zellen und hAoECs verwendet. In allen Proben können rot fluoreszierende Partikel (LDL-Partikel) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21).

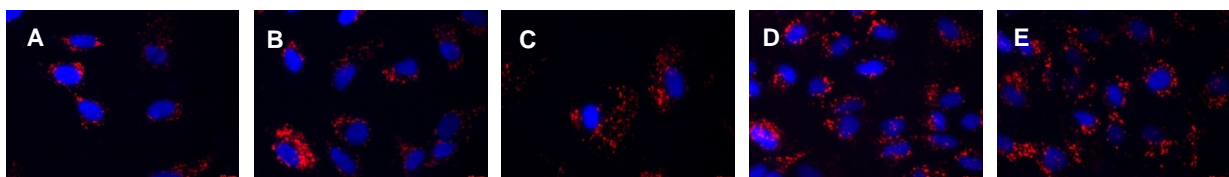


Abbildung 21: Übersicht der DIL-AC-LDL gefärbten Zellen (400-fache Vergrößerung). A: HUVEC, B: hAoEC, C-E Leukapheresebeutel-Isolate

Außerdem konnte bei den Referenzpopulationen HUVEC und hAoECs aber auch in den Leukapherese-Isolaten die Kapillarbildung *in vitro* belegt werden (vgl. Abbildung 22).

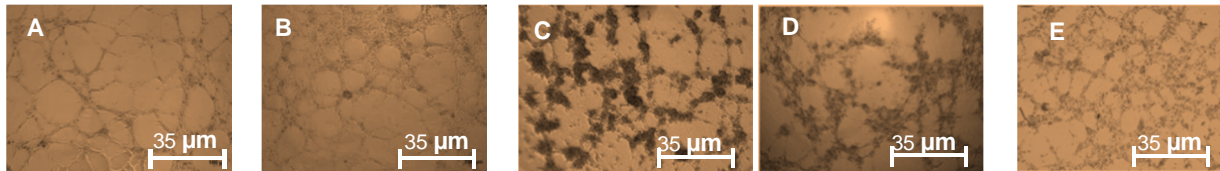


Abbildung 22: Übersicht der tube-formation Bildung verschiedener Zellpopulationen (25-fache Vergrößerung). A: HUVEC, B: hAoEC, C-D Leukapheresebeutel-Isolate, E: Human Umbilical Cord Blood Endothelial Colony Forming Cells (Fa.Lonza, Lot.Nr.01622P4A)

Um zeigen zu können, dass es sich bei dem aus den Aphereseprodukten isolierten Zelltypus nicht um die „reifere Form“ der Endothelzellen handelt (CFU-ECs) sondern um den Vorläuferzelltyp ECFC (höheres proliferatives Potential, Gefäßbildung *in vitro* und *in vivo*) werden die Oberflächenmarker der isolierten Zellen v.a. auf die Expression von CD 14 und CD 45 analysiert. Hier zeigen die ECFCs nahezu keine Expression während diese Oberflächenmarker bei den CFU-ECs sehr hoch exprimiert werden.

Die Daten für Tabelle 26 wurden zwischen Passage 1 und 6 generiert (aufgrund der geringen Ausgangszellmenge einzelner Isolate musste erst eine Expansionsphase der Zellen erfolgen).

Tabelle 26: Übersicht der FACS Ergebnisse der ECFC-Leukaphereseisolate und der Vergleichspopulationen HUVEC bzw. AoECs. Die Wert geben die prozentuale Positivität für die getesteten Oberflächenmarker wieder.

%	CD14	CD29	CD31	CD34	CD44	CD45	CD105	CD117	CD133	CD144	CD146	VEGF-R2
ECFC Isolat 24	0,0	97,5	98,6	98,0	97,1	0,1	98,5	9,8	0,2	96,4	97,4	48,8
ECFC Isolat 27	0,0	98,3	96,2	76,5	98,1	0,1	93,6	6,8	2,6	98,1	98,1	96,5
ECFC Isolat 29	0,8	97,3	96,9	73,4	97,3	2,1	96,1	3,2	11,6	97,0	97,2	97,0
ECFC Isolat 30	0,0	98,7	98,3	33,6	98,5	0,0	97,4	8,7	2,1	98,3	98,5	97,7
ECFC Isolat 31	0,0	98,0	97,9	64,3	98,0	0,1	97,7	8,5	5,1	97,7	98,0	84,3
ECFC Isolat 31	0,0	97,3	97,2	55,9	97,2	0,0	97,7	4,7	5,1	96,8	97,2	94,7
ECFC Isolat 32	0,0	98,7	98,7	98,5	98,7	0,0	98,6	13,9	3,8	98,7	98,7	98,1
ECFC Isolat 33	0,0	97,0	98,3	96,3	97,0	0,0	98,4	13,5	3,0	96,8	96,9	96,5
ECFC Isolat 34	0,0	98,2	98,7	97,6	96,8	0,0	98,9	13,7	1,0	94,9	94,5	93,7
ECFC Isolat 36	0,0	98,8	98,7	98,7	98,8	0,0	98,9	19,1	0,7	98,6	98,8	98,0
ECFC Fa.Lonza	0,2	98,8	98,6	58,0	98,8	0,0	98,7	5,2	0,0	97,8	98,8	96,2
HUVEC	0,0	98,2	98,2	2,9	96,9	0,0	98,1	27,3	0,0	98,2	98,2	95,9
hAOEC	0,0	98,7	98,7	5,2	98,5	0,2	98,5	15,7	0,4	98,6	98,7	98,0

ECFCs exprimieren lt. Literatur (Hirschi, Ingram, & Yoder, 2008; Ingram et al., 2004)

CD31, CD105, CD146, CD144, VWF und Flk-1 , sie sind negativ für CD45 und CD14. Die Expression der drei Oberflächenmarker CD34, CD133 sowie CD117 ist uneinheitlich, diese Oberflächenmarker werden z.T. auf den Zellen exprimiert.

Wie man Tabelle 26 entnehmen kann, waren die konstitutiv exprimierten Endothelzellmarker CD31 und CD105 bei allen Isolaten sowie den Vergleichspopulationen (HUVEC und hAOEC) positiv. Die Isolate stimmen außerdem mit der Expression der Oberflächenmarker CD29, CD44, CD144 und VEGF-R2 mit den Vergleichspopulationen überein. Die Expression des Oberflächenmarkers CD34

ist bei beiden Vergleichspopulationen relativ schwach - was bereits von anderen Forschungsgruppen bestätigt wurde (Müller et al., 2002) - im Gegensatz zu den Leukapherese abstammenden Zellen.

Das CD34-Antigen, ein membranständiges Protein mit einem Molekulargewicht von 116 kD, wird in unreifen hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Daneben wird das CD34-Antigen auch auf Kapillarendothelien und in embryonalen Fibroblasten gebildet. Mit zunehmender Reifung verschwindet die Expression von CD34, was auf ein Progenitor-Stadium der Zellen schließen lässt. In Abbildung 23 wird eine Übersicht der prozentualen CD34-Expression der verschiedenen ECFC-Isolate in unterschiedlichen Passagen gezeigt. Bei fast allen ECFC-Isolaten konnte ein passagenabhängiger Verlust des CD34 Oberflächenmarkers beobachtet werden. Je länger die Zellen kultiviert wurden umso geringer war der prozentuale Anteil des Oberflächenmarkers CD34. Lediglich bei zwei Zellpopulationen (ECFC Isolat 33 und 36) konnte eine annähernd gleichbleibenden Expression des Markers während der Kulturdauer gezeigt werden (siehe Abbildung 23).

Der Vorläufercharakter der isolierten Leukapherese-Zellen wurde durch die FACS-Daten bestätigt- alle untersuchten konstitutiven Endothelzellmarker (CD 31, CD105, CD29, CD44, CD146 und VEGF-R2) waren in allen Isolaten gleichermaßen nachweisbar. Die bei reiferen Endothelzellen exprimierten Oberflächenmarker CD14 und CD45 konnten bei den Leukapherese-Isolaten nicht nachgewiesen werden (<2,1%). Zudem wird der Oberflächenmarker CD144 bei reifen Endothelzellen nur sehr schwach exprimiert, hier konnte bei allen isolierten Zellpopulationen eine sehr starke Expression (>94,9%) beobachtet werden

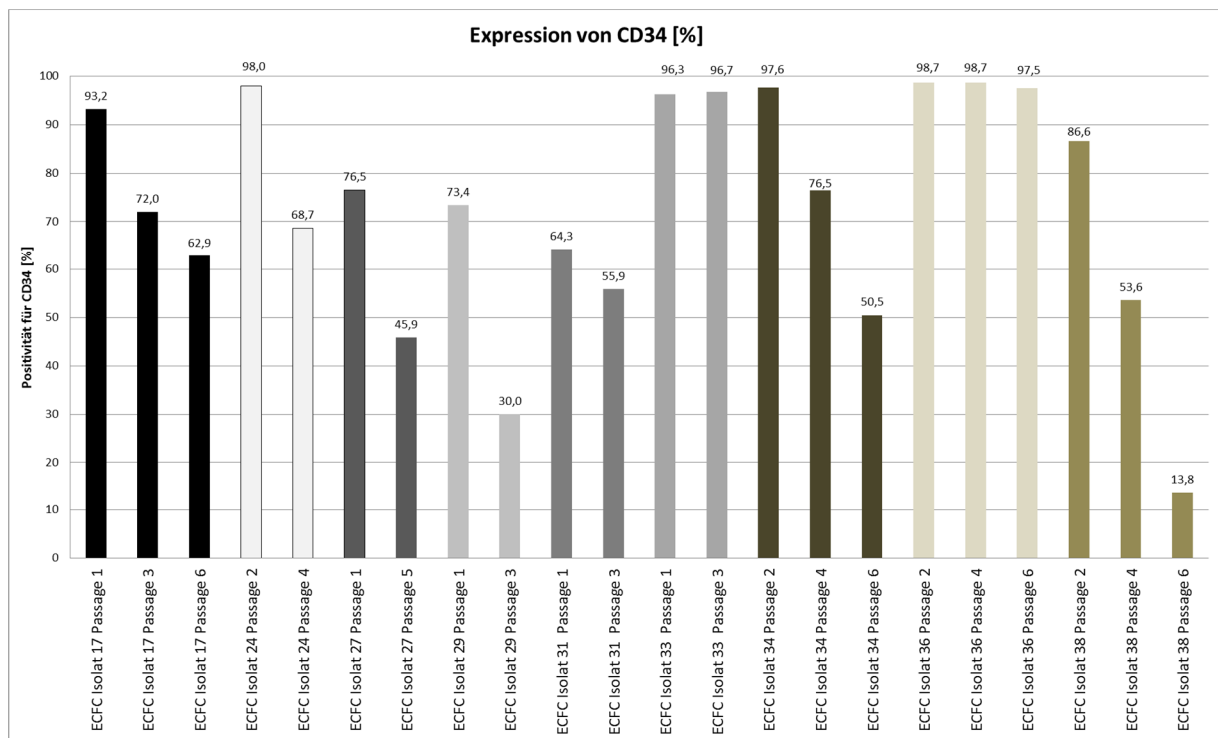


Abbildung 23: Übersicht der Expression von CD34 bei den ECFC-Populationen innerhalb verschiedener Zellpassagen.

Bei den isolierten Primärzellen aus den Leukapheresen handelt es sich dementsprechend um Progenitorzellen (Endothel-Kolonie-bildende Zellen: ECFC) und nicht um die reiferen, bereits differenzierteren CFU-ECs. Die isolierten ECFCs besitzen eine typische endotheliale Morphologie aber auch typische funktionelle Charakteristika (Kapillarbildungsfähigkeit, Aufnahme von Dil-Ac-LDL uptake, konstitutive ECFC-Oberflächenmarker)- die sie als Vorläuferzellen bestätigen und von reifen Zellen unterscheiden lassen.

1.36 Co-Kultur ECFC/MSC

Zunächst wurden mehrere Kulturmedien getestet um ein für ECFCs und hMSC kompatibles Medium zu finden (um in späteren Versuchen eine Co-Kultur zu

etablieren). Die ECFC-Zellen wurden in 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät (jeweils 200 000 Zellen pro Flasche), nach einer 2 stündigen Adhäsionszeit (im regulären ECFC-Medium: EGM-2+ 10% FCS) wurde das entsprechende Zellkulturmedium in die jeweilige Flasche pipettiert. Nach 4 Tagen (37°C, Normoxie, 5% CO₂) erfolgte die optische Beurteilung der Kulturflaschen (% Konfluenz) mit anschließendem Abtrypsinieren der Zellen (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L Versene®) und Messung der Zellzahl bzw. Zellvitalität im CASY Cell Counter TT (Fa. Roche). Tabelle 27 zeigt eine Übersicht der 6 getesteten Medien.

Tabelle 27: Übersicht der Zellzahl bzw. Zellvitalität von ECFC in versch. Kulturmedien.

Medium	Konfluenz in % nach 4 Tagen	Gesamtzellzahl (x10 ³)	Vitalität [%]
1. Alpha-MEM (1g/L Glucose) + 10% AB + ECGS + Heparin	40	1,098	53
2. Alpha-MEM (1g/L Glucose) + 5% Plättchenlysate + ECGS + Heparin	30	0,666	54
3. EGM2-Medium + 10% FCS	75	2,169	62
4. EGM2-Medium + 5% Plättchenlysate	90	1,300	52
5. EGM2-Medium + 10% AB	70	2,500	77
6. EGM2-Medium + 10% Plättchenlysate	90	1,106	52

In den beiden ersten Medien basierend auf dem Grundmedium Alpha-MEM + 10% AB-Serum bzw. 5% Plättchenlysate konnte trotz Zusatz von Heparin und ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement, BD Bioscience) keine gute Zellvitalität bzw. Zellproliferation erreicht werden.

In Medium 1 (Alpha-MEM + 10% AB-Serum + Heparin + ECGS) wurde nach 4 Tagen lediglich eine Konfluenz von ca. 40% erreicht und eine Vitalität von etwa 53%.

Auch Medium 2 (Alpha-MEM + 5% Plättchenlysat + Heparin + ECGS) zeigte ähnlich schlechte Wachstums- bzw. Vitalitätsergebnisse: hier lag die Konfluenz nach 4 Tagen bei nur etwa 30%, nur knapp die Hälfte der Zellen waren vital (53%).

Das „Vergleichsmedium“ (Medium 3), welches standardmäßig für die Kultur von ECFCs verwendet wird zeigte nach 4 Tagen Kultivierungsdauer eine gute Konfluenz der Zellen (ca. 75%) zusammen mit einer akzeptablen Vitalität (62%). Die besten Wachstumsergebnisse erzielten die Medien 4 und 6 (Basalmedium EGM-2 mit 5% PL bzw. 10% PL). Hier lag die Konfluenz nach 4 Tagen bei etwa 90% - jedoch bei niedriger Vitalität der Zellen (nur 52%). Das beste Ergebnis bezüglich Zellvitalität erzielte Medium 5 (EGM-2 + 10% AB-Serum). Hier lag der Wert mit etwa 90% deutlich höher wie bei allen anderen Testmedien. Die Konfluenz bei diesem Medium betrug nach 4 Tagen etwa 70%.

Für die weiteren Versuche wurden deshalb Medium 5 (EGM-2 + 10% AB-Serum : sehr gute Zellvitalität und gute Konfluenz) und Medium 4 (EGM-2 mit 5% Plättchenlysat: mittlere Vitalität und sehr gute Konfluenz) getestet. Medium 3, diente hier lediglich als „Vergleichsmedium“ da es für die Standardkultur von ECFC-Zellen geeignet ist. Es wird jedoch in den folgenden Experimenten nicht mehr verwendet (Wachstumskomponenten für die Zellen basieren auf FCS-Zusatz, was aufgrund des tierischen Ursprungs nicht GMP konform ist).

Um eine Co-Kultur etablieren zu können wurden im nächsten Schritt die humanen mesenchymalen Stammzellen in den beiden oben genannten Medien kultiviert, die bei der ECFC-Kultur am besten abgeschnitten haben (Medium 4 & 5). Hier sollte neben der Standardkultivierung der Zellen (Proliferation, Vitalität) vor allem auch der wichtige Parameter Differenzierungsfähigkeit getestet werden.

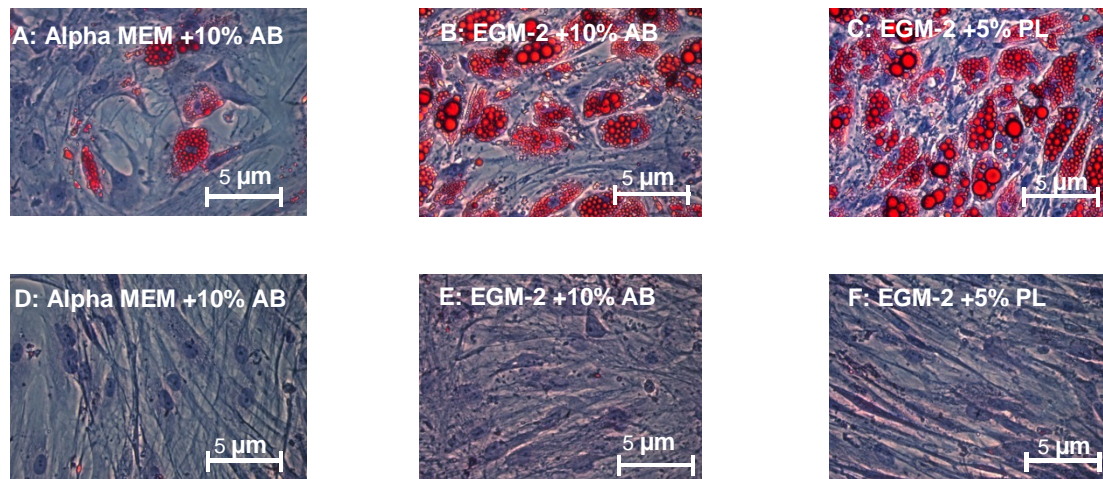


Abbildung 24: Übersicht der Ölrotfärbung der mesenchymalen Stammzellen in den verschiedenen Medien bei 200-facher Vergrößerung. Jedem Medium wurde 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt . Bild A-C: adipogen induzierte Zellen, Bild D-F nicht-adipogen stimulierte Zellen.

Hierfür wurden die MSC in den beiden Medien kultiviert bis sie eine Konfluenz von ca. 80% erreichten. Dann wurde die osteogene und adipogene Differenzierung eingeleitet. Nach 21 Tagen Differenzierungszeit wurden die Proben angefärbt (Alizarinrot bzw. Ölrot). Zum Vergleich wurde das Standardkulturmedium für MSC (Alpha-MEM +10% AB-Serum + 1% Penicillin/Streptomycin) mitgeführt.

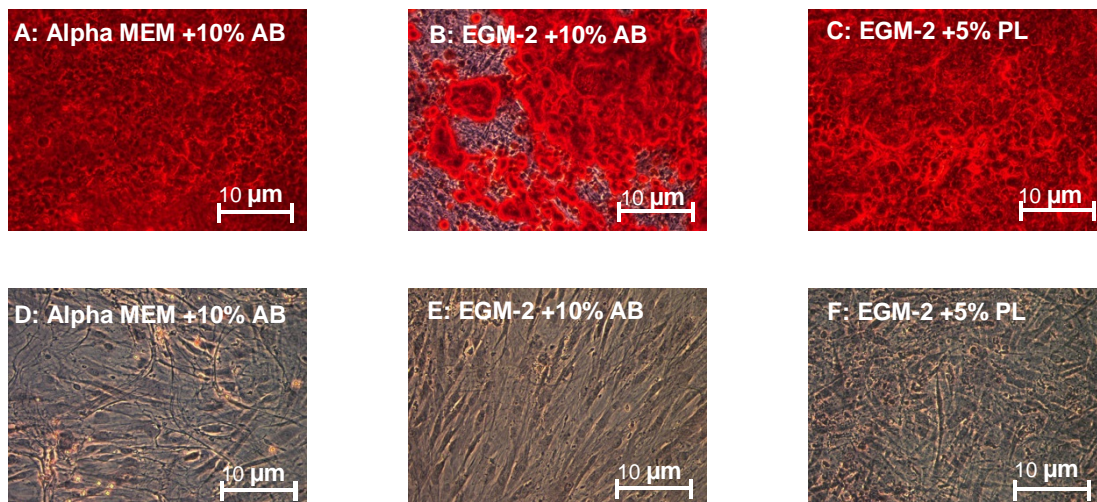


Abbildung 25: Übersicht der Alizarinrotfärbung der mesenchymalen Stammzellen in den verschiedenen Medien bei 100-facher Vergrößerung. Jedem Medium wurde 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Bild A-C: osteogen induzierte Zellen, Bild D-F nicht-osteogen stimulierte Zellen.

Die mesenchymalen Stammzellen zeigten in allen Medien eine sehr gute Differenzierungsfähigkeit.

Sowohl bei der adipogenen (Abbildung 24) wie auch bei der osteogenen Differenzierung (Abbildung 25). Daher sind beide Medien für eine Co-Kultur mit ECFC-Zellen sehr gut geeignet. Die beiden Testmedien zeigen bei den adipogen induzierten Zellen sogar eine etwas höhere Anzahl an Fettvakuolen d.h. ein leicht besseres Differenzierungspotential wie Zellen, die in Standardkulturmedium (Alpha-MEM + 10% AB+ 1% P/S) vorkultiviert wurden (siehe Abbildung 24).

Co-Kultur in EGM-2 mit 10% FCS : Kontrolle

Wie Abbildung 26 veranschaulicht, findet beim reinen hECFC-Pool (ohne MSCs) bereits nach 4 Stunden eine starke Tube formation-Bildung statt. Der reine hMSC-Pool hingegen zeigt keine Kapillar-Bildung.

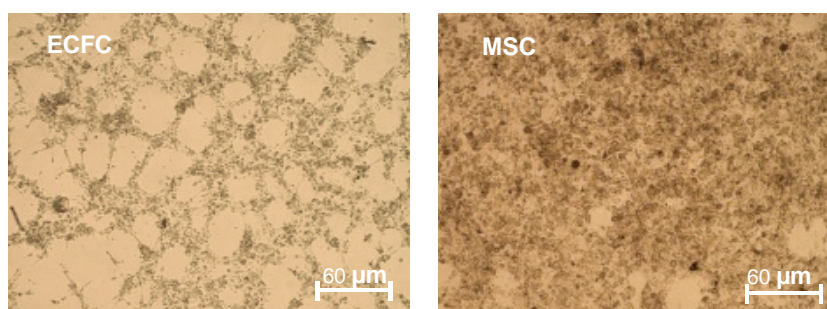


Abbildung 26: Tube formation Übersicht der Reinkulturen in EGM-2 + 10% FCS. Linkes Bild: nur ECFC-Zellen, rechtes Bild: nur MSC (25-fache Vergrößerung).

Die MSC-Zellen bilden einen konfluenten Zellrasen aus. Bei Betrachtung der Co-Kulturen von MSC und ECFC in Abbildung 27 sieht man, dass es unabhängig vom jeweiligen Mischungsverhältnis der Zellen zu einer Ausbildung an Tubes kommt.

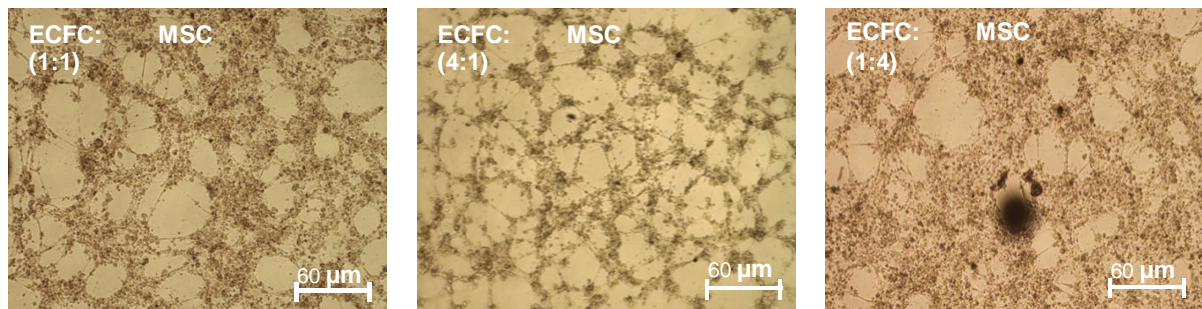


Abbildung 27: Tube formation-Übersicht der Co-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen in EGM-2 + 10% FCS. Vergrößerung: 25-fach

Die ECFCs werden von den MSC in ihrer Tube formation-Bildung nicht gehindert. Die MSCs könnten evtl. auch durch parakrine Signale der ECFCs ebenfalls in der Lage sein sich aktiv an der Ausbildung der Tube formation zu beteiligen. Auch andere Forschungsgruppen zeigten in ihren *in vitro* und *in vivo* Experimenten den synergistischen Effekt von MSC auf die Kapillarbildungsfähigkeit von ECFC bzw. HUVEC-Zellen (Au, Tam, Fukumura, & Jain, 2008; Kolbe et al., 2011; Traktuev et al., 2009).

Co-Kultur in EGM-2 mit 10% Plättchenlysat

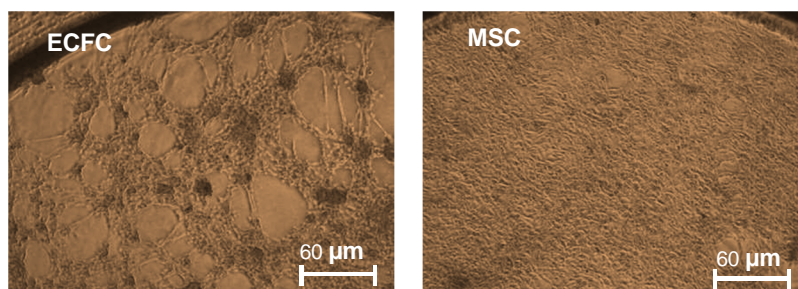


Abbildung 28: Tube formation Übersicht der Reinkulturen in EGM-2+ 10% PL. Linkes Bild: nur ECFC-Zellen (ECFC-Pool aus 5 Leukapheresebeuteln-Isolaten), rechtes Bild: nur MSC Zellen (hMSC-Pool aus 15 isolierten Populationen).

Der reine hMSC-Pool (ohne ECFCs) zeigt wie auch beim zuvor getesteten Kontrollmedium keine Tube formation-Bildung, die Zellen bilden auch hier einen

konfluenten Zellrasen aus. Beim reinen hECFC-Pool (ohne MSCs) findet bereits nach 4 Stunden eine starke Tube formation-Bildung statt (siehe Abbildung 28).

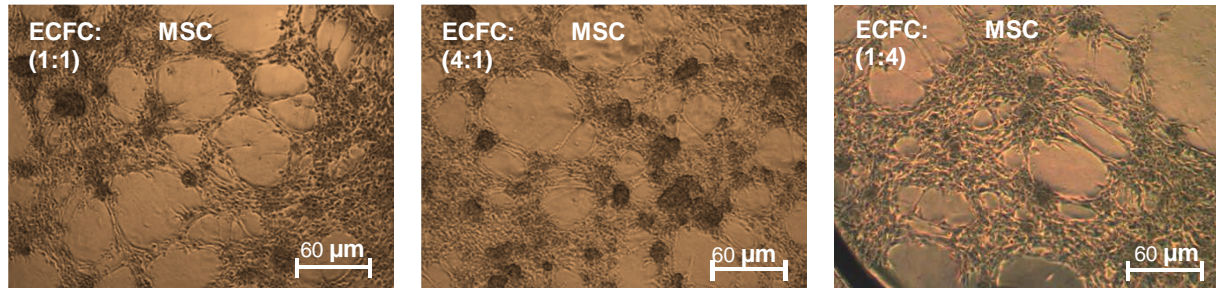


Abbildung 29: Tube formation-Übersicht der Co-Kulturen in verschiedenen Mischungsverhältnissen in EGM-2 + 10% PL.

Die Co-Kultur im gleichen Mischungsverhältnis (1 Teil MSCs : 1 Teil ECFCs) zeigt nach 4 Stunden ebenfalls eine starke Tube formation-Bildung (im Vergleich zum reinen ECFC-Pool etwas geringer ausgeprägt).

Bei einem Mischungsverhältnis von 1 Teil MSCs zu 4 Teilen ECFCs, kommt es zu einer sehr starken Tube formation (mit reinem ECFC-Pool vergleichbar). Selbst ein Mischungsverhältnis mit deutlicher Minderheit der tube- ausbildenden ECFCs (4 Teile MSCs zu einem Teil ECFCs) führt nach 4 Stunden zu einer deutlichen Ausprägung von tubes (wenn auch etwas schwächer ausgeprägt wie bei der reinen ECFC-Kultur). In Matrigel bilden alle Co-Kulturen (sowohl in FCS- wie auch in PL-haltigen EGM-2 Medium) kapillar-ähnliche Strukturen aus (siehe Abbildung 27 und Abbildung 29).

Die Fotos aus Abbildung 28 und Abbildung 29 wurden mit der Wimasis Software ausgewertet. In Abbildung 30 werden typische Größen der Tube formation (wie z.B. Verzweigungspunkte, Anzahl an Kapillaren und die bedeckte Fläche) aufgetragen. Der Einfluss auf spezielle Größen wie die bedeckte Fläche, Anzahl an Netze/Schleifen etc. ist durch Zugabe von MSC unwesentlich beeinflusst worden. Es

lassen sich geringfügig weniger Verzweigungspunkte sowie eine leichte Reduktion der Anzahl an Tubes feststellen in Anwesenheit von MSCs.

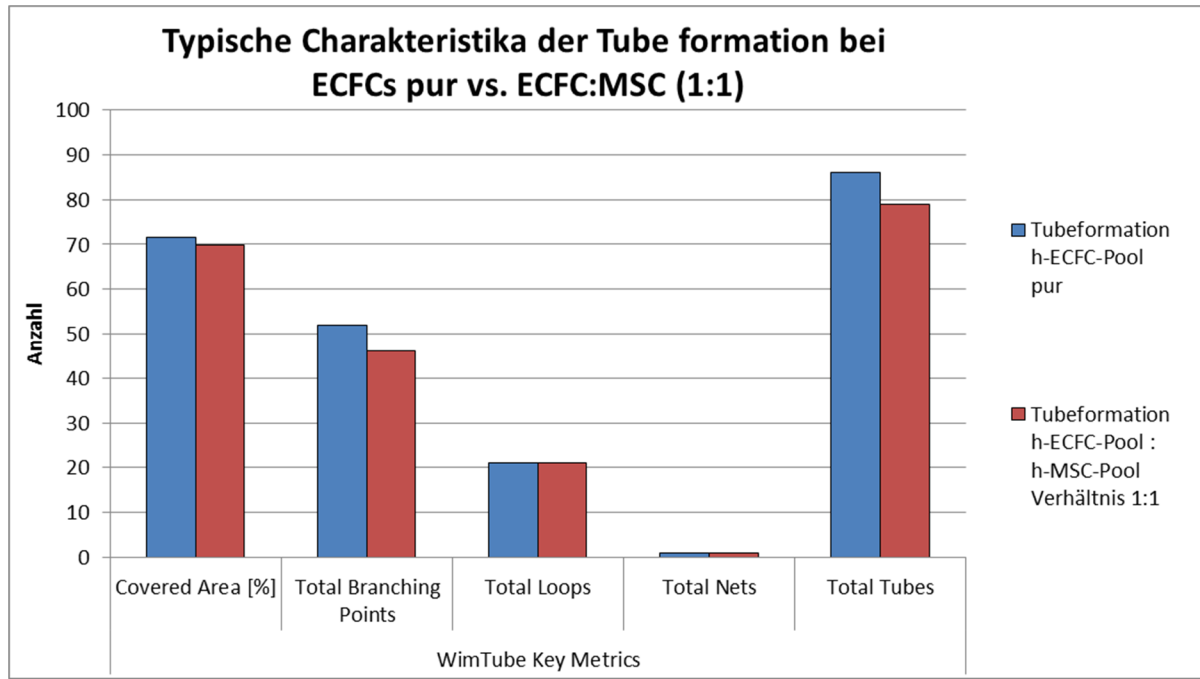


Abbildung 30: Wimasis Auswertung der reinen ECFC-Kultur vs. der Co-Kultur (Mischungsverhältnis 1:1).

Im nächsten Schritt sollte die gegenseitige Beeinflussung der ECFC und MSC näher untersucht werden. In diesem Experiment wurden die Wechselwirkungen der beiden Zelltypen sowohl in direktem Kontakt (Direkter Versuch Zell-Zellinteraktion) wie auch indirekt (Mediumüberstand der ECFC wurde auf die MSC-Kulturen gegeben) bestimmt. Im direkten Zell-Zell Kontaktexperiment wurden zu einem humanen MSC-Pool (bei konstanter Zellzahl) verschiedene Konzentrationen an ECFCs (isoliert aus Leukapheresebeuteln) zugesetzt - hierbei sollte untersucht werden ob es zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung der hMSC in Anwesenheit der ECFCs kommen würde. Eine positive Beeinflussung der osteogenen Differenzierung von fetalen MSC durch Umbilical cord blood-derived endothelial colony-forming cells

(ECFC aus der Nabelschnur) konnte bereits nachgewiesen werden (Liu et al., 2012). Im nachfolgenden Experiment wurden der hECFC-Pool (n=5) bzw. der hMSC-Pool (n=15) bis zur Subkonfluenz in Kultur genommen (beide im Co-Kulturmedium EGM-2 + 10% PL). Nach dem Ablösen der MSC-Zellen wurden diese in 6-Well Platten ausgesät (pro Well werden 15.000 Zellen/cm² d.h. 150.000 MSC-Zellen pro 6-Well-Vertiefung ausgesät). Die Zahl der MSCs wurde bei allen 6-Well Platten konstant gehalten. Nach einer zweistündigen Adhäsionsphase wurden die ECFC-Zellen abgelöst und in definierter Zellzahl zu den MSC gegeben. Nach der Zugabe der ECFC zu den MSCs erfolgte die Kultivierung der Zellen in 3- 4 fach Replikaten in osteogenem Medium (siehe 1.15.1). Als Negativkontrolle wurden 3 Wells mit ECFC-Zellen ausgesät (ohne MSC), welche ebenfalls im osteogenen Medium kultiviert wurden, und nach t=21 Tagen mittels Alizarinrot angefärbt wurden. Nach der Fixierung und Anfärbung (Alizarinrot) aller Wells wurde eine Quantifizierung der eingelagerten Farbstoffmenge nach Gregory et al. durchgeführt (Gregory et al., 2004). Hierbei wurde nach dem Anfärben der Probenmatrices der Alizarinrot-Farbstoff durch eine Essigsäure- Extraktion wieder aus den angefärbten mineralischen Matrices gelöst und anschließend die Extinktion des gelösten Farbstoffs photometrisch bei 405 nm bestimmt. Abbildung 31 zeigt eine Übersicht der gemessenen OD-Werte der einzelnen Proben. Auffallend war, dass der Wert der MSC-Probe ohne ECFC-Zusatz unter den OD-Werten der getesteten Co-Kulturen (1:1 bzw. 4:1) lag. Wurden MSCs und ECFCs in einem Verhältnis von 1:1 bzw. 4:1 kultiviert lag der OD-Wert deutlich höher wie der OD-Wert der MSC-Reinkultur. Bei einem Mischungsverhältnis MSC zu ECFC von 10:1 bzw. 50:1 konnte kein Unterschied im Extinktionswert zur Reinkultur der MSC detektiert werden. Hier ist die Anzahl an ECFCs in den Proben so gering, dass keine Beeinflussung der MSC

stattfind. Erstaunlicherweise fand auch eine Mineralisierung in der Reinkultur der ECFC-Zellen statt. Der Anteil an eingelagertem Alizarinrotfarbstoff betrug hier ca. die Hälfte des Farbstoffanteils der MSC-Kultur.

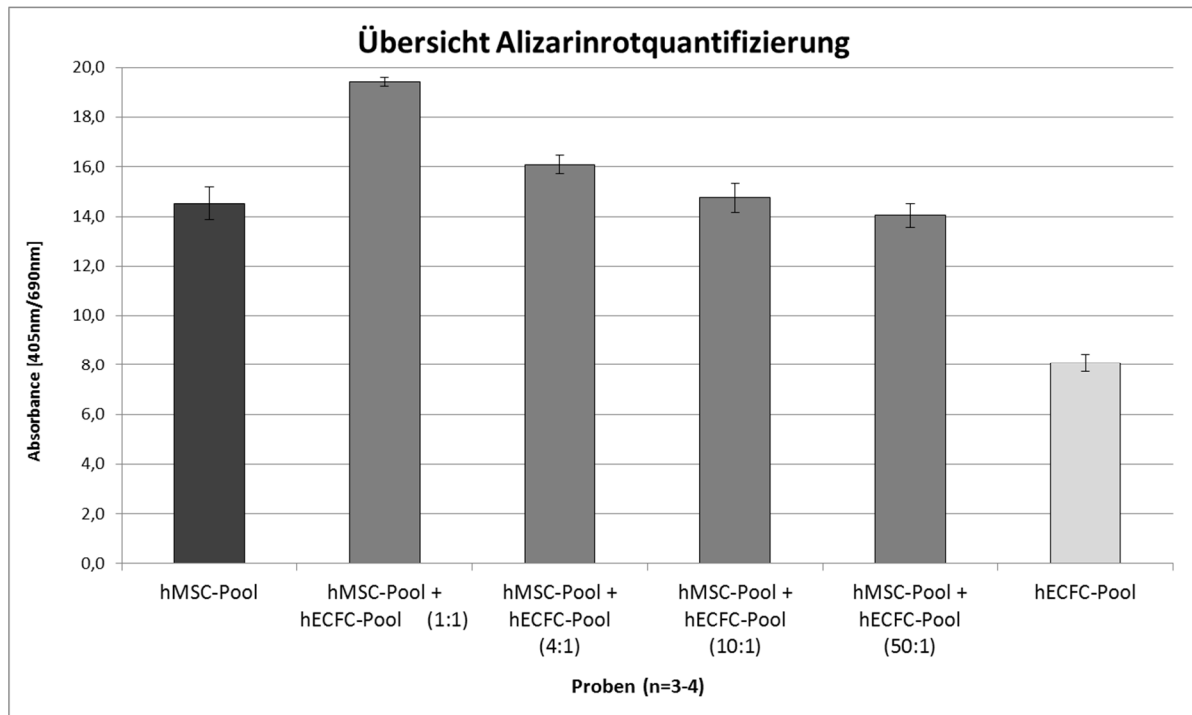


Abbildung 31: Übersicht der OD-Werte der Alizarinrotquantifizierung des direkten Versuchs.

In Tabelle 28 wurden die gemessenen OD-Werte der Co-Kulturen bzw. der ECFC-Reinkultur prozentual zum OD-Wert der reinen MSC-Kultur ermittelt.

Tabelle 28: Rechnerische Ermittlung der prozentualen Farbstoffmenge in Abhängigkeit zum hMSC-Pool.

Probe	OD-Wert (405nm/690nm)	Prozentual zu hMSC Pool (=100%)
hMSC-Pool4	14,5	100
hMSC-Pool4 + hECFC-Pool1 (1:1)	19,4	134
hMSC-Pool4 + hECFC-Pool1 (4:1)	16,1	111
hMSC-Pool4 + hECFC-Pool1 (10:1)	14,8	102
hMSC-Pool4 + hECFC-Pool1 (50:1)	14,0	97
hECFC-Pool1	8,1	56

Durch die Zugabe von ECFCs zu den MSC-Zellen konnte eine Steigerung der Mineralisierung beobachtet werden, je höher hierbei die Anzahl an zugegebenen ECFC-Zellen war desto höher war das osteogene Mineralisierungspotential der MSC. Eine MSC/ECFC Co-Kultur (Mischungsverhältnis 1:1) erreichte Werte von 134%. Dementsprechend fand eine positive Beeinflussung der MSC bzw. der osteogenen Mineralisierung durch die Anwesenheit der ECFCs statt.

Im Gegensatz zur Mehrheit der allgemeinen Beschreibungen von ECFC-Zellen in der Literatur wurde bei den selbst isolierten Zellen (aus Leukapherese-Beuteln) die Eigenschaft beobachtet, nicht nur stimulierend auf die osteogene Differenzierung von MSC zu wirken (Liu et al., 2012) sondern auch selbst osteogen zu differenzieren. Auch von anderen Zellen der ECFC-Familie, den HUVEC-Zellen, wurde bereits beschrieben, dass sie in der Lage sind selbst osteogen zu differenzieren (Aguilar-Vazquez et al., 2008). HUVEC-Zellen fördern in Co-Kulturen mit MSC auch die Mineralisierung der MSC (Wang et al., 2011) bzw. sind in der Lage indirekt- über sekretierte Faktoren- deren osteogene Differenzierung zu verbessern (Saleh, Whyte, Ashton, & Genever, 2011).

Ziel des nächsten Experiments war es, in einem indirekten Versuch, die Wechselwirkung von ECFC und MSC nachzuweisen. Hierfür wurde ECFC-konditioniertes Medium verwendet um den Einfluss auf die osteogene Differenzierung der MSCs zu beobachten (mit der Fragestellung ob sekretierte Moleküle bzw. Wachstumsfaktoren der ECFCs zu einer Verbesserung der osteogenen Differenzierung führen?). Für dieses Experiment wurde ein hECFC-Pool (isoliert aus Leukapheresebeuteln; n=5) bis zur Subkonfluenz in Wachstumsmedium (EGM-2+ 10% PL) kultiviert, nach einem Waschschrift erfolgte dann die Zugabe von osteogenem Standardmedium für t= 72 Stunden.

Das Medium verblieb für $t = 72$ Stunden auf den Zellen (in dieser Zeit konnten sie Wachstumsfaktoren bzw. Moleküle sezernieren). Nach 72 Stunden wurde das konditionierte Medium abgenommen und mit „osteogenem Standardmedium“ verdünnt.

Im Test wurde

- a) nicht-konditioniertes Medium („osteogenes Standardmedium“),
- b) konditioniertes Medium 1:1 verdünnt mit osteogenem Medium und
- c) konditioniertes Medium 1:10 verdünnt mit osteogenem Medium verwendet.

Für die Prüfung der drei verschiedenen Medien wurden jeweils 150.000 MSC-Zellen pro 6-Well-Vertiefung ausgesät und direkt die osteogene Differenzierung durch die Zugabe des entsprechenden Testmediums a) bis c) gestartet. Nach 21 Tagen wurde wie im vorangehenden Experiment eine Alizarinrotquantifizierung durchgeführt.

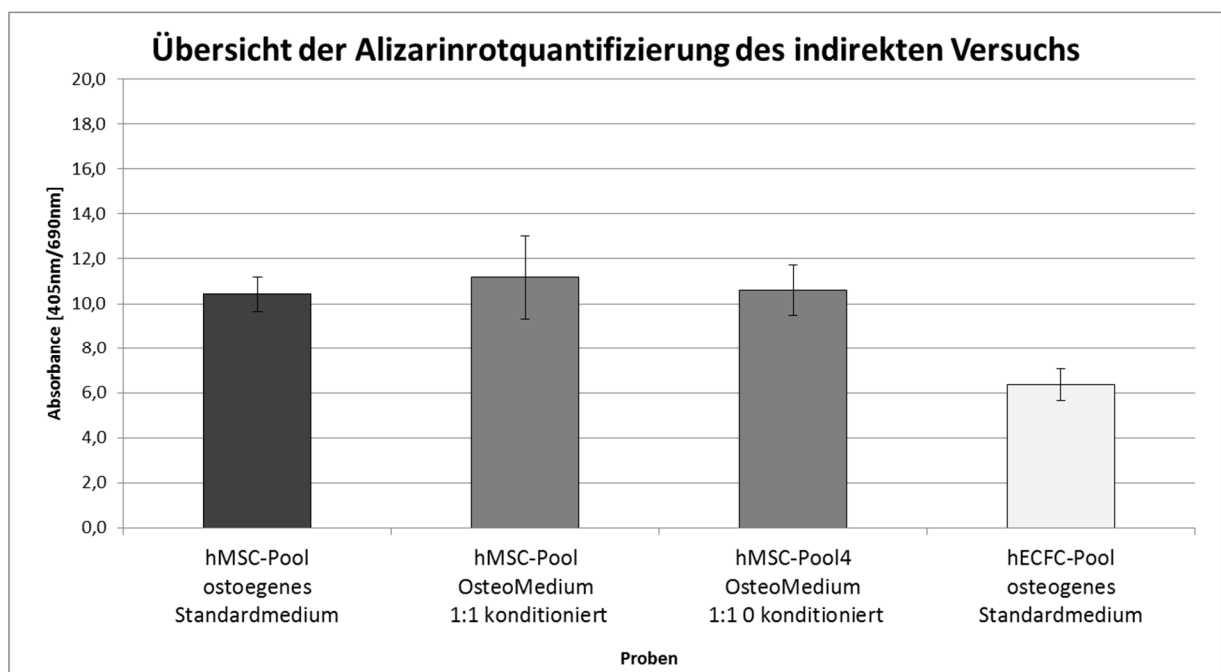


Abbildung 32: Übersicht der OD-Werte der quantitativen Alizarinrotbestimmung des indirekten Versuchs.

Fand eine Vorkonditionierung des Mediums statt und wurde dieses dann im Verhältnis 1:1 (mit osteogenem Medium) auf die MSC-Zellen gegeben konnte eine leichte Steigerung des osteogenen Potentials beobachtet werden (um ca. 7%). Die Zytokine u.a. Stoffe die von den ECFC-Zellen während der Konditionierungsphase synthetisiert wurden führten zu einer Verbesserung der osteogenen Differenzierung der MSC (ohne direkten Zell-Zell-Kontakt, rein über sezernierte Faktoren der ECFCs).

Tabelle 29: Rechnerische Ermittlung der prozentualen Farbstoffmenge in Abhängigkeit zum hMSC-Pool in Standardmedium.

<i>Probe</i>	<i>OD-Wert (405nm/690nm)</i>	<i>Prozentual zu osteogenem Standardmedium</i>
hMSC-Pool osteogenes Standardmedium	10,4	100
hMSC-Pool 1:1 konditioniertes Medium	11,2	107
hMSC-Pool 1:10 konditioniertes Medium	10,6	102
hECFC-Pool Standardmedium osteogenes	6,4	61

Die Steigerung des osteogenen Potentials konnte in den Experimenten sowohl indirekt (über sezernierte Faktoren der ECFC-Zellen) wie auch direkt mittels Zell-Zell-Interaktionen (direkte Zugabe von ECFC-Zellen zu einer definierten Anzahl hMSCs) nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine deutlich höhere Steigerung des osteogenen Potentials der MSC (ca: 30%) durch den direkten Zell-Zell-Kontakt mit den ECFC erreicht (siehe Tabelle 28) während bei der indirekten Methode lediglich eine Steigerung des osteogenen Potentials der MSCs um ca. 7% erreicht wurde (siehe Tabelle 29). Die ECFC-Isolate aus Leukapheresebeuteln haben sowohl direkt (Zell-Zell-Kontakt) wie auch indirekt (über sezernierte Faktoren) die osteogene Differenzierung der hMSCs gefördert. Hierbei zeigt der direkte Zell-Zell-Kontakt aber

deutlich positivere Effekte auf die Mineralisierung, zu diesem Schluss kommen auch Co-Kulturexperimente zw. HUVEC und MSC von Steiner et al. (Steiner, Lampert, Stark, & Finkenzeller, 2012).

ECFC-Zellen sind weithin für ihre Angiogenese-Fähigkeit (Tube formation-Bildung) bekannt, es gibt aber nur wenige Berichte über die Fähigkeit dieser Zellpopulation zur Bildung einer osteogener Matrix (Aguilar-Vazquez et al., 2008) -auch wenn viele Forscher den positiven Effekt von ECFC auf MSC zur Ausbildung einer osteogenen Matrix beschreiben (Wang et al., 2011). Um einen Überblick zu bekommen welche ECFC-Populationen die Fähigkeit aufweisen selbst osteogen zu differenzieren, wurden hAoECs, HUVEC, ECFC (Fa. Lonza, Lot.Nr. 01622P4A) sowie ECFC-Primärzellen aus 5 Leukapherese-Isolaten ausgesät und ab Subkonfluenz (80%) für 21 Tage in osteogenem Standardmedium kultiviert. Für jede ECFC-Population wurde eine Negativkontrolle in entsprechendem Kulturmedium mitgeführt.

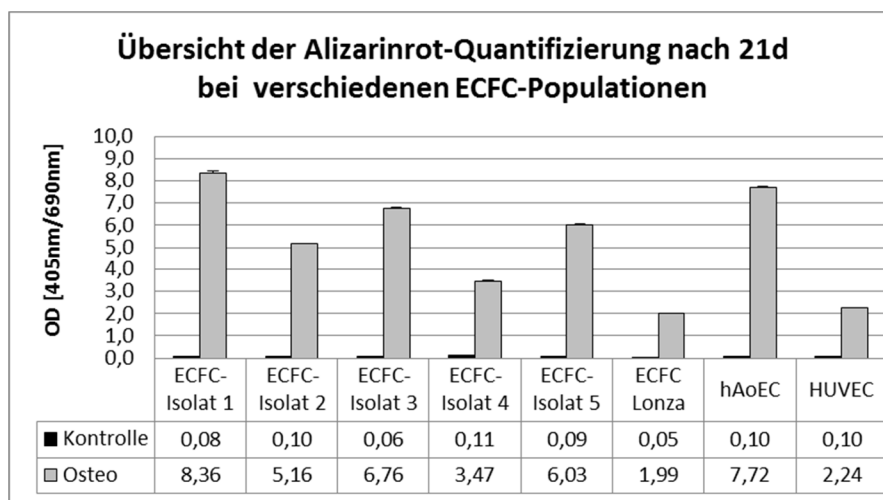


Abbildung 33: Übersicht der Alizarinrotquantifizierung verschiedener ECFC-Populationen nach 21 Tagen osteogener Differenzierung bzw. der jeweiligen unstimulierten Negativkontrolle (n=3).

In Abbildung 33 wird eine Übersicht der getesteten ECFC-Populationen dargestellt. Bei ausnahmslos allen Populationen konnte nach der 21-tägigen osteogenen

Differenzierungsphase eine mineralische Ablagerung, optisch wie auch photometrisch, nachgewiesen werden. Die Stärke der Mineralisierung variierte innerhalb der ECFC-Populationen. Bei den ECFC-Isolaten Nr.1, Nr. 2 Nr. 3 und Nr.5 wie auch bei den hAoECs konnte eine starke Alizarinroteinlagerung gemessen werden ($OD > 6,0$). Während bei den anderen drei Populationen (HUVEC, ECFC der Fa. Lonza, Lot.Nr. 01622P4A und ECFC-Isolat Nr. 4) nur eine geringe mineralische Deposition statt fand (jedoch im gemessenen OD-Wert deutlich über den Werten der jeweiligen Negativkontrollen).

1.37 In-vitro Versuche mit Knochenersatzmaterialien

1.37.1 Kollagen-/Mineralimplantate: HA, TCP, HA-TCP-Konstrukte

Zunächst wurden drei verschiedene Kombinationsmaterialien getestet (Eigenherstellung Fa. Aesculap, B.Braun). Sie bestanden jeweils aus der organischen Komponente Kollagen I (jeweils zu 44%) und aus den anorganischen Bestandteilen Hydroxylapatit und/ oder Trikalziumphosphat. Die mineralischen Partikel besaßen eine Größe von 50- 100 μm . Die Porengröße variierte bei allen drei Materialien zwischen 50 bis 350 μm .

Die Kombinationsmaterialien behielten *in vitro* ihre 3 dimensionale Struktur über 8-10 Wochen (formstabil). Alle Kombinationsmaterialien wiesen zudem eine sehr hohe Wasseraufnahmekapazität auf und passten sich optimal, durch ihren elastischen Charakter, an Defekte an.

1.37.1.1 Proliferation, Zellverteilung und Differenzierung auf HA, TCP und HA-TCP-Konstrukten

Die drei Materialien wurden mit der gleichen Zellzahl (zunächst einseitig, 1 Mio Zellen pro Träger) besiedelt und 6 bzw. 11 Tagen kultiviert (5% CO₂, 37°C). Dann wurden die Materialien aus ihren Kulturgefäßen entnommen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium und Promega-Farbstoff überführt. Vitale Zellen führen zu einer Umsetzung des Farbstoffs (wie in 1.18.1 beschrieben), die Extinktion des umgesetzten Farbstoffs wurde bei 490 nm gemessen und war proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

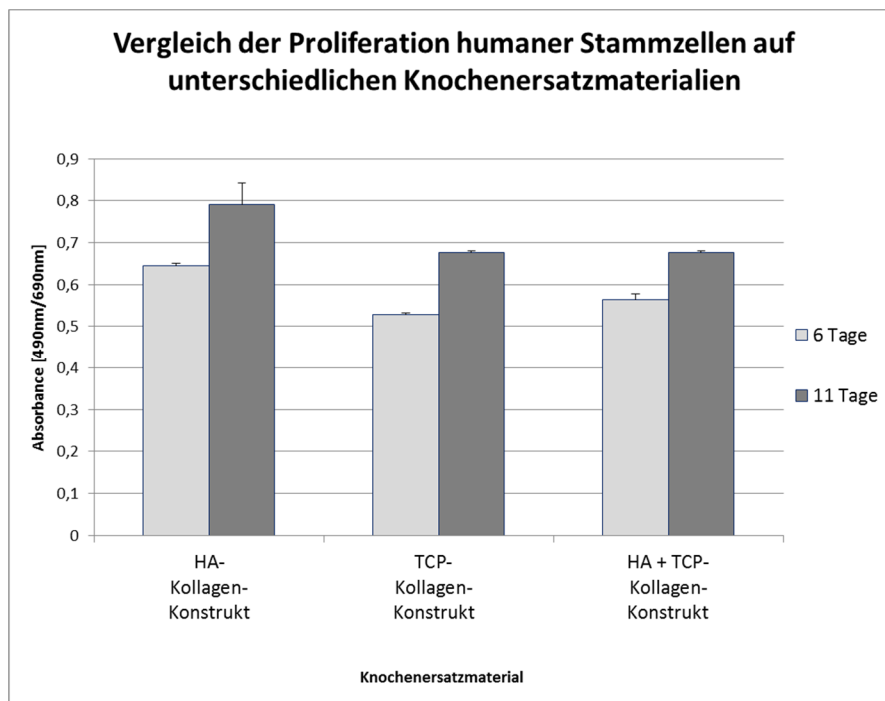


Abbildung 34: Vergleich der Proliferation von hMSC auf drei unterschiedlichen Trägermaterialien nach 6 bzw. 11 Tagen (n=2).

Bei allen drei Materialien konnte nach 6 Tagen weniger umgesetzter Farbstoff nachgewiesen werden wie nach 11 Tagen. Es fand eine Zunahme der Zellzahl und

damit eine Zunahme des umgesetzten Farbstoffanteils über den Inkubationszeitraum statt.

Wie die Fluoreszenzaufnahmen aus Abbildung 35 und Abbildung 36 belegen, führte die einseitige Besiedelung jedoch zu einer Ungleichverteilung der Zellen im Material. Deshalb wurde in den weiteren Experimenten stets beidseitig besiedelt (1. Besiedelung, Adhärenz-Phase, 180° Drehung des Trägers, 2. Besiedelung, Adhärenz Phase, Überführung des besiedelten Trägers in Kulturmedium). Diese Beobachtung konnte bei allen drei getesteten Kollagen-/Mineralkonstrukten gemacht werden. Exemplarisch wurde in Abbildung 35 eine Aufnahme eines HA-TCP-Konstrukts gezeigt. Die Zellen sind in das Material - entlang der Kollagenfasern - eingewachsen (siehe gelbe Pfeile).

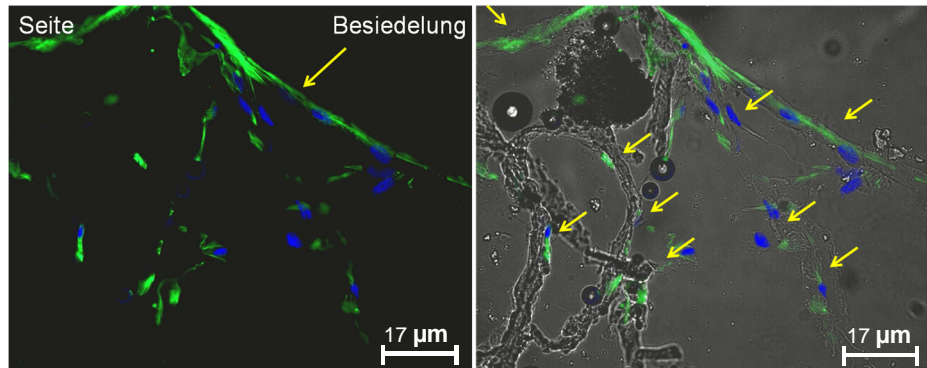


Abbildung 35: Fluoreszenz-Aufnahme (100-fache Vergrößerung) eines HA-TCP Konstrukts, Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau), Zytoskelett mit Phalloidin (grün). Gelbe Pfeile markieren die Besiedelungsseite. Auf dem rechten Bild wurde die Fluoreszenzaufnahme mit der Durchlichtaufnahme überlagert.

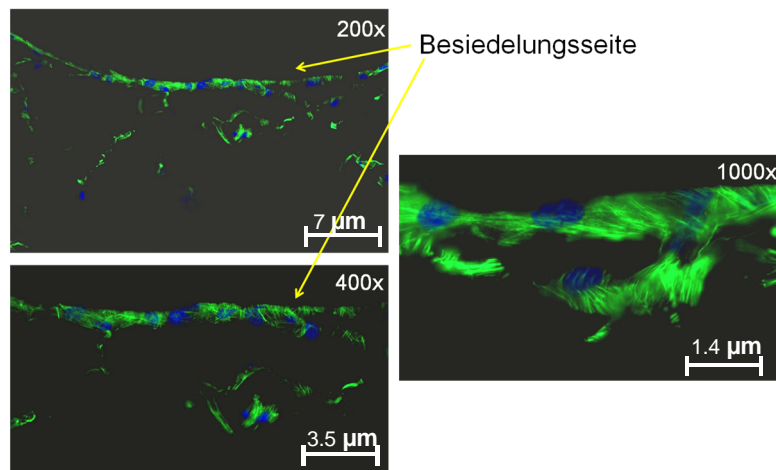
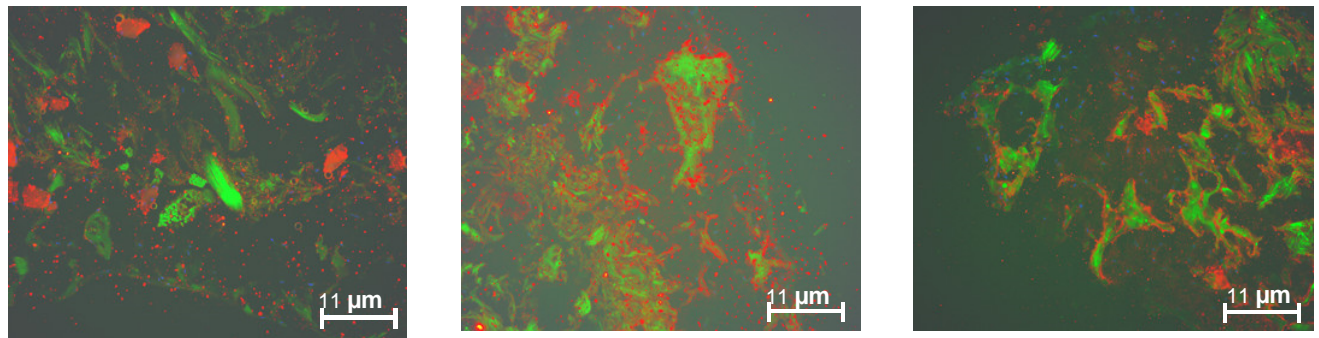


Abbildung 36: Querschnitt eines besiedelten Trägermaterials (20 µm-Schnitt) in verschiedenen Vergrößerungen. Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau), das Zytoskelett mit Phalloidin (grün). Gelbe Pfeile markieren die Besiedelungsseite.

Die Kollagenfasern lassen sich gut auf dem Überlagerungsbild aus Abbildung 35 (Fluoreszenz/ Durchlicht) erkennen, oben links im Bild kann man außerdem einen mineralischen Partikel beobachten.

Obwohl man insgesamt eine gute Zellverteilung im Materialinneren beobachten konnte, war die Mehrheit der Zellen auf der Besiedelungsseite zu finden. Im nächsten Schritt wurde nach der Zellverteilung, die Differenzierungsfähigkeit der hMSC-Zellen auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien überprüft. Hierfür wurden hMSC auf ein Trägermaterial gegeben, und nach einer Wachstumsphase in osteogenes Standardmedium überführt. Nach den verschiedenen Inkubationszeitpunkten wurde eine Doppelfärbung (humanes Kollagen I / Phalloidin) angefertigt. Wie in 1.1.2.3 beschrieben wird während der Osteogenese von den Osteoblasten in einem zweistufigen Prozess die mineralisierte extrazelluläre Matrix synthetisiert. Zunächst kommt es zur Ausbildung eines unmineralisierten Gewebes, des sog. Osteoids, welches hauptsächlich aus Kollagen I besteht. Die Hohlräume

sind zunächst mit Wasser gefüllt. Später erfolgt dann die Mineralsierung d.h. die Einlagerung von Kalziumphosphat.



Negativkontrolle

7 Tage osteogen differenziert

14 Tage osteogen differenziert

Abbildung 37: Fluoreszenzfärbung gegen humanes Kollagen (rot) und Phalloidin (grün) bei undifferenzierten bzw. 7 oder 14 Tagen lang osteogen differenzierten Proben (100-fache Vergrößerung). Linkes Bild: undifferenzierte Negativkontrolle auf Trägermaterial; Mitte: 7d osteogen differenzierte Zellen auf Träger und rechtes Bild: 14 d osteogen differenzierte Zellen auf Trägermaterial.

Da die Matrix aller drei Knochenersatzmaterialien neben der jeweiligen mineralischen Komponente (HA bzw. TCP) ebenfalls aus Kollagen I, jedoch bovinen Ursprungs, besteht sollte eine Anfärbung mit einem Antikörper, welcher spezifisch an humanes Kollagen I bindet erfolgen. Bei der undifferenzierten Negativkontrolle war die Kollagenanfärbung viel diffuser als bei den osteogen differenzierten Proben (Kollagenansammlung rund um die Zellen wie eine Art „Schicht“ um den Zellkörper, außerdem war quantitativ mehr Kollagen I bei den osteogen differenzierten Proben vorhanden). Bei allen Proben waren sehr große, rote Partikel sichtbar, hier hat wahrscheinlich der Kollagen I- Antikörper unspezifisch an die mineralischen HA- bzw. TCP Partikel gebunden.

Zur Visualisierung des Unterschieds von unbesiedelten zu besiedelten HA/TCP-Kollagen-Konstrukten wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von beiden Proben angefertigt (siehe Abbildung 38).

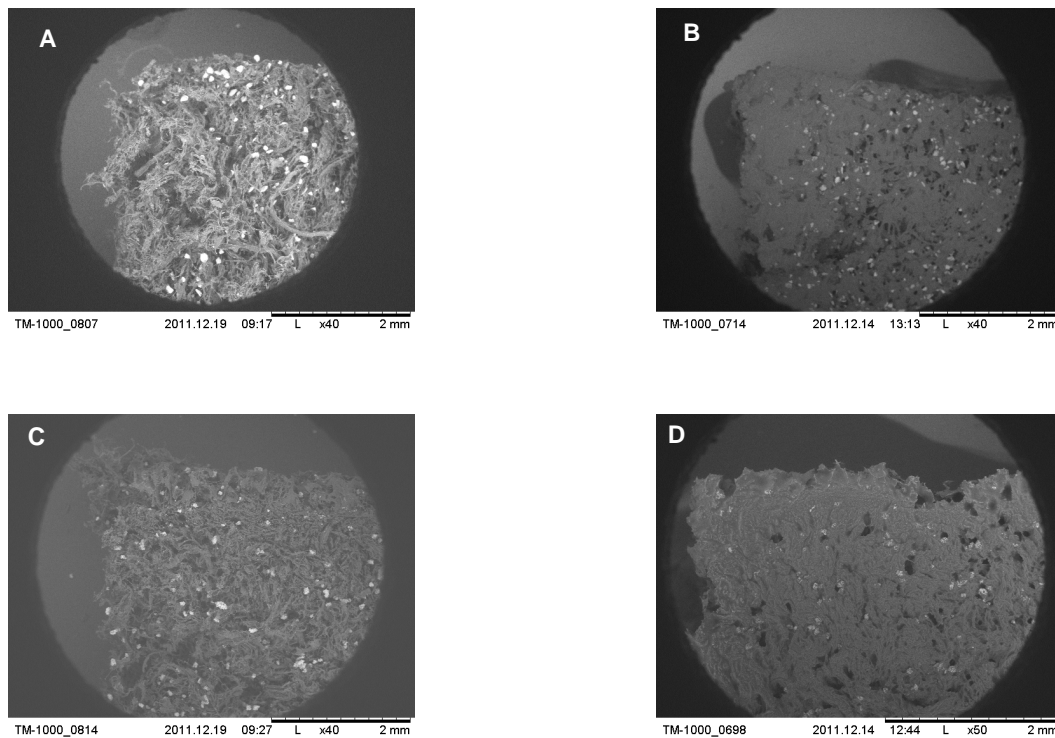


Abbildung 38: REM-Aufnahmen (40-fache Vergrößerung) von A: unbesiedeltes HA-Kollagen-Trägermaterial und B: HA-Kollagen-Trägermaterial, welches mit Zellen besiedelt wurde C: unbesiedeltes TCP-Kollagen-Trägermaterial D: zellbesiedeltes TCP-Kollagen-Material.

In den REM-Aufnahmen konnte man die lockere, faserige Kollagenstruktur gut erkennen ebenso wie die mineralischen HA bzw. TCP Partikel, die als körnerförmige, weiße Teilchen auf den REM-Aufnahmen sichtbar waren (siehe Abbildung 38 A und C). Wurden Zellen auf das Trägermaterial gegeben, konnte die Kollagenstruktur nur noch teilweise im Inneren des Materials aufgefunden werden, vor allem an den äußeren Rändern fand eine deutliche „Verdichtung“ des Materials statt. Diese „Verdichtung“ konnte man bei allen drei mineralisch-organischen Trägerersatzmaterialien beobachten.

Die Besiedelung der Materialien erfolgte beidseitig, die Zellen verteilten sich dann von den Außenbereichen bis ins Innere des Materials (siehe Abbildung 40). In den Außenbereichen konnten deshalb mehr Zellen gefunden werden wie im Innenbereich

der Träger (siehe Abbildung 39). Der Träger ermöglichte aufgrund seines durchgängigen Porensystem (Porengröße 50 bis 350 μm) das Einwachsen der Zellen bis ins Materialinnere. Die besiedelten Bereiche waren optisch deutlich verdichtet, die ursprüngliche Kollagenstruktur konnte nicht mehr identifiziert werden (siehe Abbildung 38 B und D).

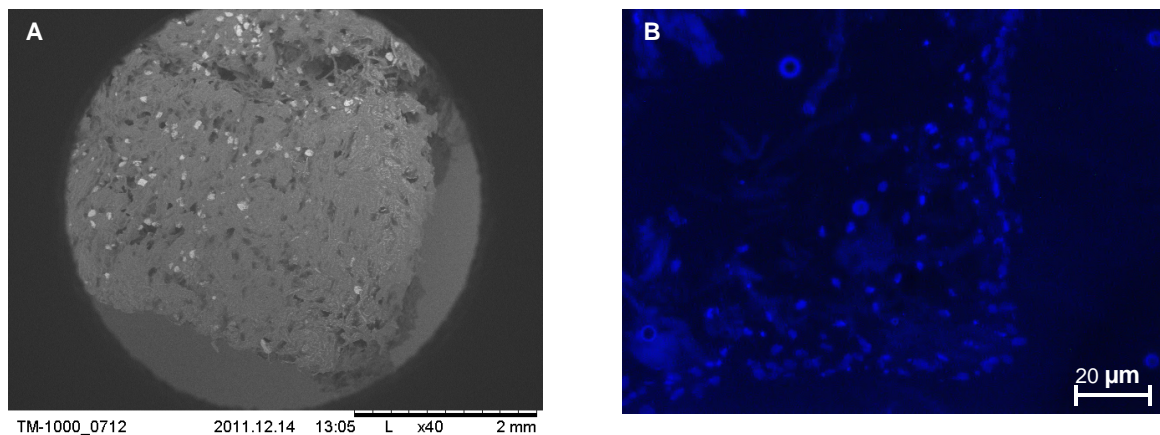


Abbildung 39: A: REM Aufnahme eines mineralisch-organischen Zellträgers 40-fache Vergrößerung B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (DAPI) zur Visualisierung der Zellverteilung im organisch-mineralischen Zellträger 100-fache Vergrößerung .

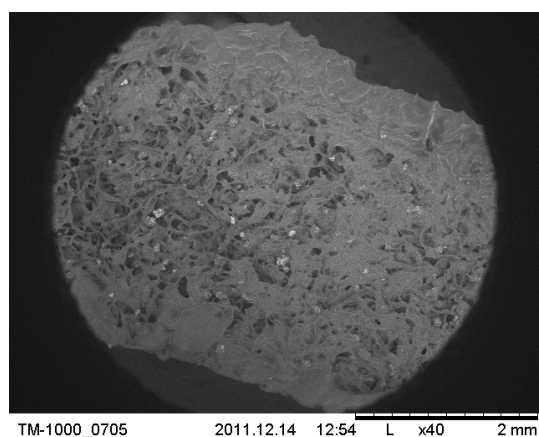


Abbildung 40: Beidseitig besiedeltes TCP-Kollagen-Trägermaterial mit deutlich verdichteter Ober- und Unterseite.

Um nachzuweisen, dass die verdichteten Trägermaterialien auch andere physikalische Eigenschaften aufweisen, wie die unbesiedelten Trägermaterialien wurden Rückstellkraftmessungen durchgeführt. Hierbei gibt der komprimierte Anteil Aufschluss über die Härte bzw. Elastizität des Materials. Für die Rückstellkraftmessungen wurden die drei mineralisch-organischen Testmaterialien (HA, TCP und HA-TCP jeweils mit 44% Kollagenanteil) verwendet. Die Trägermaterialien wurden jeweils vorbehandelt (mit 10% AB-Medium gespült) mit Zellen besiedelt und nach 14 tägiger Wachstumsphase mit nachfolgender 21 tägiger osteogener Differenzierungsphase (+ undifferenzierte Negativkontrolle) wurden die Träger experimentell getestet. Der Vergleich sollte zeigen in wie weit sich die mechanischen Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien nach der osteogenen Differenzierung gegenüber den undifferenzierten (sowie unbesiedelten) Materialien verändern würden. Es wurden zunächst 3 Stammzellpopulationen getestet (Spender 109, 113 und 117) und in einem späteren Versuch die Osteosarkomazellen SAOS-2. Passage 1-Zellen wurden aufgetaut und in 10% AB-Medien vorkultiviert (Passage 2). Nach 7 Tagen wurden die Zellen abgelöst und beidseitig auf die vorbehandelten Trägermaterialien gegeben (800.000 Zellen/ Material). Die Zellen wurden auf die Knochenersatzmaterialien aufgebracht (doppelseitig: 3 ½ Stunden Besiedelung auf der Oberseite und 3 ½ Stunden Besiedelung auf der Unterseite (je 400.000 Zellen pro Seite) und 14 Tage bei 37°C, Hypoxie (5% O₂) inkubiert. Nach 14 Tagen wurde pro Material und Zellpopulation eine Probe in ein osteogenes Differenzierungsmedium gegeben. Die Stammzellen differenzierten durch die Additive im osteogenen Medium (Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure) zu Osteoblasten und bauten eine Knochengrundsubstanz auf, die danach mineralisierte (wie in 1.15.1 beschrieben).

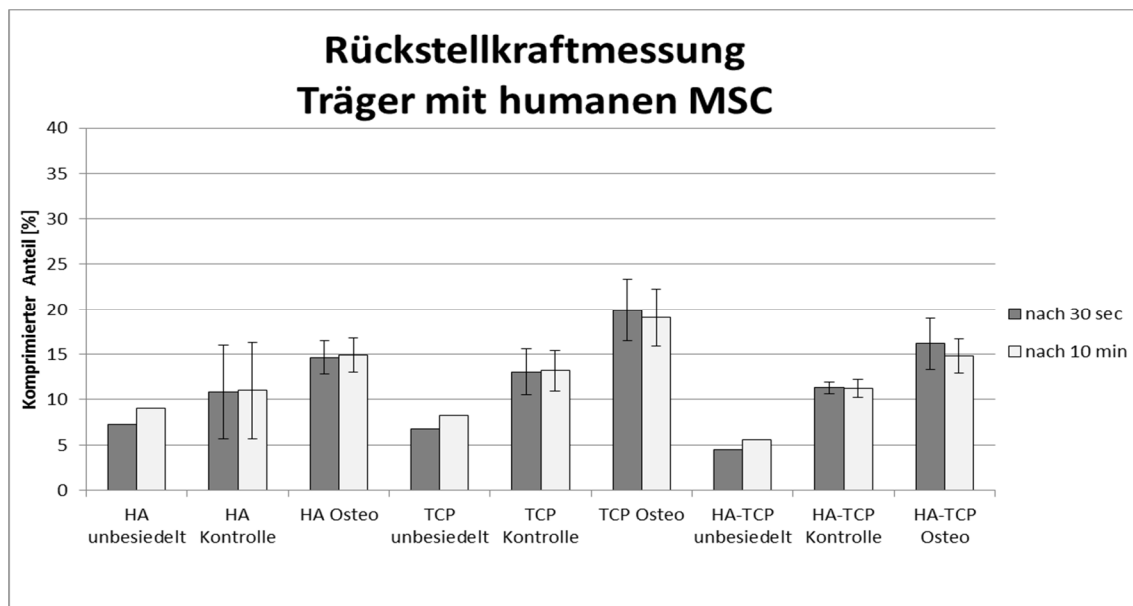


Abbildung 41: Übersicht aller Rückstellkraftmessungen der drei verschiedenen Trägermaterialien mit humanen Stammzellen (3 Spender). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen osteogen differenziert.

Nach 14 Tagen wurde pro Material und Zellpopulation ein Probe für 3 Wochen in ein Kontrollmedium (Alpha-MEM+ 10% FCS) überführt. Hier handelte es sich um eine Negativkontrolle mit undifferenzierten Zellen, die keine Matrix synthetisierten. Die Trägermaterialien mit den differenzierten Knochenzellen bzw. den undifferenzierten Kontrollen (sowie unbesiedelte Trägermaterialien) wurden nach insgesamt 5 Wochen (hiervon 2 Wochen Wachstumsphase+ 3 Wochen Differenzierung bzw. Kontrolle) zur Messung der Rückstellkraft zur Fa. Aesculap (Tuttlingen) gebracht. Der Transport erfolgte bei Raumtemperatur in den jeweiligen Probengefäßen (wo auch die Kultivierung stattfand). Die Trägermaterialien wurden auf dem Probentisch unterhalb des Indentors platziert. Die Position des Mediumbehälters war variabel und konnte über Feststellschrauben fixiert werden. Die Proben wurden mit einer Axialkraft von 45 N komprimiert. Nach einer Relaxationszeit von 30 Sekunden bzw. 10 Minuten wurden die Proben erneut mit einer Kraft von 45 N komprimiert. Im Anschluss an die dritte Be- und darauffolgende Entlastung der Probe wurde die Prüfung abgebrochen.

Je weiter sich die Probe nach dieser dritten Entlastung wieder dem Ausgangszustand annäherte d.h. sich elastisch verformte desto niedriger war der (irreversibel) komprimierte Anteil. Bei wenig elastischen d.h. starren, steifen, verdichtete Proben war der (irreversibel) komprimierte Anteil höher da die Probe nicht mehr in den Ausgangszustand zurückfinden konnte und (dauerhaft) verformt blieb. Mit den erhaltenen Daten konnte der komprimierte Anteil mittels der in Kapitel 1.24 beschriebenen Formel 3 und Formel 4 berechnet werden. Die irreversible Kompressibilität von zellfreien Trägern lag im Mittel bei etwa 7%, nach einer Zellbesiedelung der Träger ohne osteogene Induktion lag die irreversible Kompressibilität im Durchschnitt bei ca. 11%, mit osteogener Induktion der Zellen bei ca. 16% (siehe Abbildung 41). Hier zeigte sich bei allen drei Materialvarianten eine Veränderung des kompressiblen Anteils, das Material wurde durch die osteogene Differenzierung der Zellen weniger elastisch (d.h. die Elastizität hat abgenommen), durch die Mineralisierung kam es zu einer Zunahme der Härte/ Steifigkeit. Bei der Wiederholung des Versuchs wurden SAOS-Zellen eingesetzt. Diese Osteosarkomazellen sind bekannt dafür, dass sie *in-vitro* zu den am besten mineralisierenden Zellpopulationen gehören. Der Versuchszeitraum wurde auf 3 Monate ausgedehnt. Die Negativkontrolle mit SAOS-2 Zellen in Kulturmedium (ohne Zusatz osteogener Additive) lag in etwa bei den Werten der Negativkontrollen der entsprechenden Stammzellpopulationen (der komprimierte Anteil lag bei ca. 10%). Nach 5 Wochen lag der komprimierte Anteil bei etwa 20% und damit ebenfalls im gleichen Bereich wie bei den osteogen differenzierten Stammzellen (siehe Abbildung 42). Nach 3 Monaten war der komprimierte Anteil auf 26% (für das TCP-Kollagen Material) bzw. auf 30% für das HA-Kollagen Material gestiegen (mehr abgelagerte mineralische Matrix führte zu einer geringeren Materialelastizität und damit zu einem höheren

komprimierten Anteil). Aufgrund der geringen Materialausgangsmenge konnten jeweils leider nur Duplikate gemessen werden.

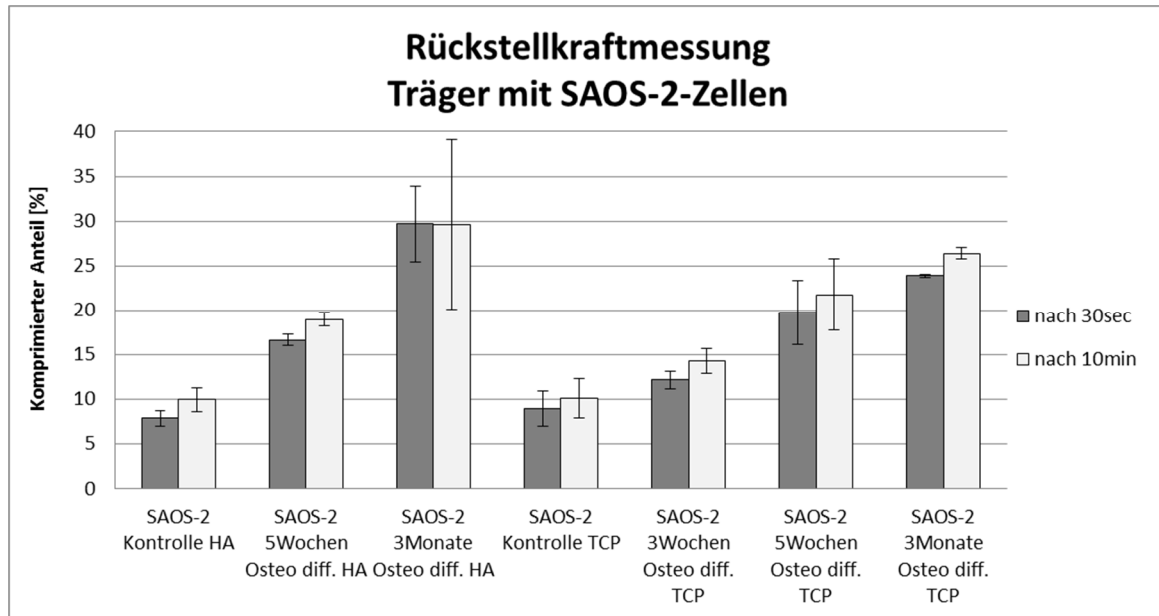


Abbildung 42: Rückstellkraftmessung mit SAOS-2 Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten (n=2).

Die Besiedelung der verschiedenen Mineral-Kollagen-Konstrukte mit Zellen führte nur zu einer relativ leichten Veränderung der Materialelastizität. Wurden die Zellen jedoch osteogen differenziert änderten sich die Materialeigenschaften grundlegend, die Elastizität fiel stark ab und das Material nahm durch die mineralischen Ablagerungen der Zellen an Festigkeit und Härte zu. Je länger hierbei die osteogene Differenzierung der Zellen durchgeführt wurde (siehe Abbildung 42), desto höher war der Anteil der irreversibel komprimiert wurde d.h. das Material war weniger elastisch und die Festigkeit des Materials hatte während des osteogenen Differenzierungsprozesses zugenommen.

1.37.2 Nanogel®

In den ersten Besiedelungsversuchen wurden mesenchymale Stammzellen direkt auf das Nanogel®-Material der Firma Teknimed (Frankreich) gegeben und nach einer Adhärenzphase vorsichtig mit Kulturmedium überschichtet. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde dann über eine Farbstoffzugabe zum Medium die Vitalität der Zellen photometrisch ermittelt. Die Extinktion des umgesetzten Farbstoffs wurde bei 490 nm gemessen und war proportional zur Anzahl vitaler Zellen. Obwohl im Versuch hohe Zellzahlen (200 000 Zellen und mehr) eingesetzt wurden konnten kaum vitale Zellen über die Farbstoffreaktion detektiert werden. Da evtl. der hohe Anteil an destilliertem Wasser im Nanogel® zu einem osmotischen Effekt und damit zum Absterben der Zellen führte, wurde das Nanogel® in den nachfolgenden Experimenten vorbehandelt (für mehrere Stunden in 10% AB-Medium inkubiert) und erst anschließend mit Zellen besiedelt. Trotz der Vorbehandlung konnten auch hier nach verschiedenen Versuchszeitpunkten kaum vitale Zellen detektiert werden. Nach 0 bzw. 4 Tagen konnten mit Hilfe des Promega-Zellvitalitätsassays keine vitalen Zellen mehr nachgewiesen werden (Absorptions-Messwerte der Proben lagen etwa auf demselben Level wie die Werte der zellfreien Negativkontrolle). Der Zeitwert nach 14 Tagen wurde deshalb nicht mehr durchgeführt. Nach 5 Tagen wurde von den Proben ein Ausstrich auf einen Objektträger gemacht (keine Unterscheidung Zellen/Nanopartikel möglich). Die Anfärbung der Proben mit DAPI-Farbstoff und die anschließende Überlagerungen der Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen zeigte mehrere Zellkerne in dem vom Nanogel® dominierten Proben (siehe Abbildung 43). Die Nanogel®partikel aggregierten zu großen, makroskopisch deutlich sichtbaren Komplexen. Die Zellkörper konnten aber nicht mehr visuell erkannt werden. Bei der

Analyse einer reinen Nanogelverdünnung (ohne Zellen) wurden Partikelgrößen bis 30 μm gemessen (Aggregate), die eigentlichen Nanogel®partikel besitzen lt. Hersteller jedoch lediglich eine Größe von 100- 200 nm.

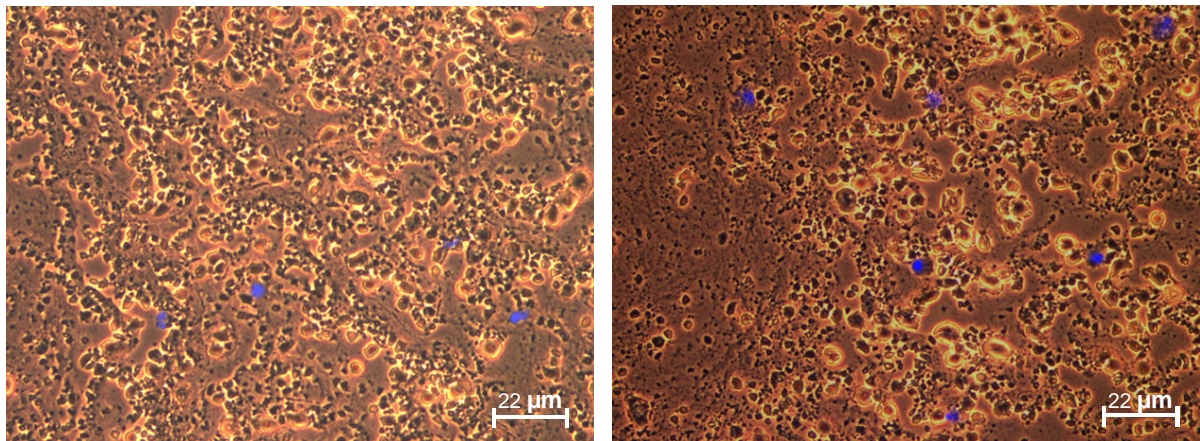


Abbildung 43: hMSC auf Nanogel nach 11 Tagen. Überlagerungen von Durchlichtaufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen (DAPI) bei 100-facher Vergrößerung.

Da trotz der Vorinkubation der Nanogel®proben mit Kulturmedium keine Verbesserung der Zellvitalität eingetreten war, wurde im nachfolgenden Experiment ein Protein-Coating getestet. Das Serumprotein Albumin ist in der Lage an Kalziumphosphat-Oberflächen zu binden (Mavropoulos et al., 2011; Zeng, Chittur, & Lacefield, 1999). Für dieses Experiment wurde eine konzentrierte humane Albuminlösung auf das Nanogel® gegeben und 24 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂). Nach dem Aufbringen der Zellsuspension wurden die Proben nach einer Adhärenzphase vorsichtig mit Kulturmedium überschichtet. Nach 3 Tagen konnte eine leichte Zellvitalität (gegenüber der Negativkontrolle ohne Zellen, OD=0,2) photometrisch detektiert werden (OD= 0,6). Die Anwesenheit von Albumin (konzentriert, 200 g/L) hat in diesem Experiment die Zellen scheinbar teilweise vor dem negativen Einfluss des Nanogel®präparats geschützt. Weitere Versuche mit

verdünnten Albuminlösungen (physiologischer Wert von 40 g/L) zeigten jedoch konträre Ergebnisse. Des Weiteren wurde das pastenartige Nanogel® unverdünnt auf einen konfluenten Zell-Layer (SAOS-2-Zellen) aufgebracht. Nach einer 24 stündiger Inkubationsphase (37 °C, 5% CO₂) konnten mikroskopisch keine adhärenen Zellen mehr nachgewiesen werden, man konnte aber wie im vorigen Experiment makroskopisch eine große Anzahl an Nanogel-Aggregaten erkennen (siehe Abbildung 44). Es war jedoch keine deutliche Abgrenzung von Zellen zu Nanopartikeln möglich.

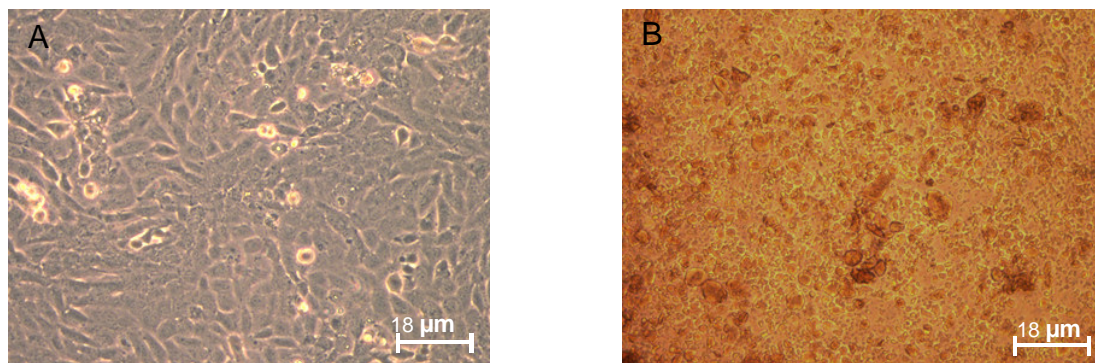


Abbildung 44: Konfluente Zellrasen (SAOS-2 Zellen) A: vor der Nanogelzugabe B: 24 Stunden nach der Nanogelzugabe.

Um nachzuweisen, ob sich noch vitale Zellen in der Nanogel-Zell-Suspension befanden, wurde eine Neuaussaat in neue Zellkulturflaschen mit frischem Kulturmedium vorgenommen. Es konnten aber auch nach mehreren Tagen keine adhärenen Zellen beobachtet werden.

Bei diesem Experiment konnte nicht, wie beispielsweise bei Agardiffusionsversuchen, eine Art Hemmhofbildung um das pastenförmige Gel beobachtet werden, da es sich im Lauf der Inkubationszeit zunehmend im Kulturmedium auflöste. Hier entstand die Idee, das Nanogel in Kulturmedium zu suspendieren und in verdünnter Form auf die Zellen aufzubringen um den toxischen Effekt des Materials zu reduzieren und die Toxizität zu bestimmen.

Anwendung von Nanogel®-Verdünnungen

Verschiedene Nanogel®verdünnungen (in Kulturmedium) wurden angefertigt und auf eine definierte Anzahl Zellen (10. 000 Zellen pro Well) gegeben. Nach mehreren Waschschritten wurde Kulturmedium mit zugesetztem Promega-Farbstoff zu den Zellen gegeben und nach 4 Stunden die umgesetzte Farbstoffmenge photometrisch bestimmt (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay).

Die anfänglich getesteten Nanogelverdünnungen wurden zu niedrig gewählt (1: 40, 1: 80, 1: 800 und 1: 8000), hier war der Anteil an nicht vitalen Zellen immer noch sehr hoch (Daten nicht gezeigt). In dem nachfolgenden Wiederholungsexperiment (gleiche Versuchsbedingungen) wurden höhere Nanogel®verdünnungen gewählt (1: 10 000; 1: 20 000 und 1: 40 000), die Ergebnisse können Abbildung 45 entnommen werden. In der unbehandelten Negativkontrolle konnte eine hohe Farbstoffumsetzung (OD= 1,1) gemessen werden. Bei allen Proben mit Nanogel®-Zusatz lag der OD-Wert deutlich niedriger. Die Messungen zeigten aber eine klare Tendenz: je höher die Nanogel®- Verdünnung gewählt wurde desto höher war die umgesetzte Farbstoffmenge und damit die Zellvitalität. Alle Nanogel®- behandelten Zellen wiesen deutlich geringere Extinktionswerte auf (nur ca. 1/5 der unbehandelten Kontrolle).

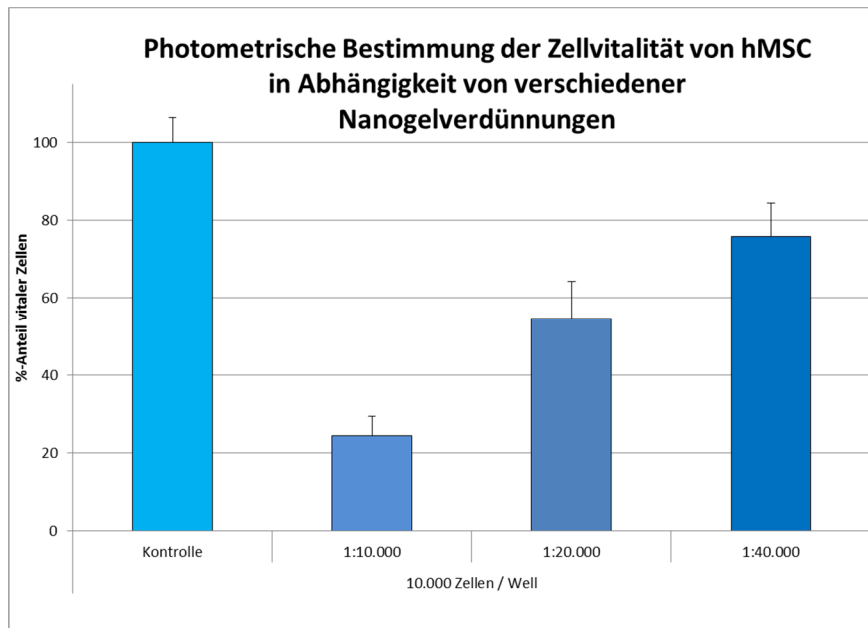


Abbildung 45: Messung des umgesetzten Farbstoffanteils zur Bestimmung der Zellvitalität von hMSC in Abhängigkeit von verschiedenen Nanogelverdünnungen.

Der Versuch wurde für 3 Stammzellpopulationen von verschiedenen Knochenmarkspendern durchgeführt. Die Tendenz war bei allen hMSC-Populationen die gleiche: je höher die gewählte Nanogel®-verdünnung war, desto vitaler waren die Zellen (die Stärke des Nanogel®-Effekts variierte jedoch von Population zu Population). Eine Nanogel®-Verdünnung von 1:20.000 reduzierte die Vitalität der Zellen auf etwa die Hälfte der unbehandelten Kontrolle. Um die Toxizität des Nanogel®-Materials zu reduzieren wurde in einem weiteren Experiment ein Coating des Nanogels® mit humanem Albumin durchgeführt. Das Gel wurde in Gegenwart einer physiologischen Albuminkonzentration (40g/L) für 48 Stunden vorinkubiert bevor eine definierte Zellzahl (200 000 Zellen) auf das Material gegeben wurde. Am Versuchstag wurde das Medium entfernt und die Zellsuspension auf das vorbehandelte Nanogel® gegeben. Nach einer zweistündigen Adhärenzphase wurde vorsichtig mit frischem Kulturmedium (+ 40g/L Albumin) überschichtet. Nach einer Inkubationsdauer von 1, 4, 10 bzw. 14 Tagen wurde eine photometrische

Farbstoffmessung durchgeführt (CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay).

Wie man Abbildung 46 entnehmen kann, konnte kein Zellwachstum auf dem Nanogel®-Material detektiert werden. Alle Extinktionswerte waren extrem gering (nur minimal über der Negativkontrolle Nanogel® ohne Zellen). Auch die Vorinkubation des Nanogel®-Materials mit einem „Albumin-Coating“ zeigte keinen positiven Effekt auf dessen Zytotoxizität. In den folgenden Abbildungen (Abbildung 47 bis Abbildung 50) wird der Einfluss verschiedener Nanogelverdünnungen auf die Zellvitalität bei verschiedenen Stammzellspendern gezeigt. Hier wurden jeweils die Proben ohne Albuminzusatz in blau, die Proben mit Albuminzusatz (physiologische Konzentration von 40 g/L) in grün abgebildet. Bei den in den Diagrammen dargestellten Werten handelt es sich jeweils um 4-fach Werte (4 unabhängige Wells deren Mittelwert

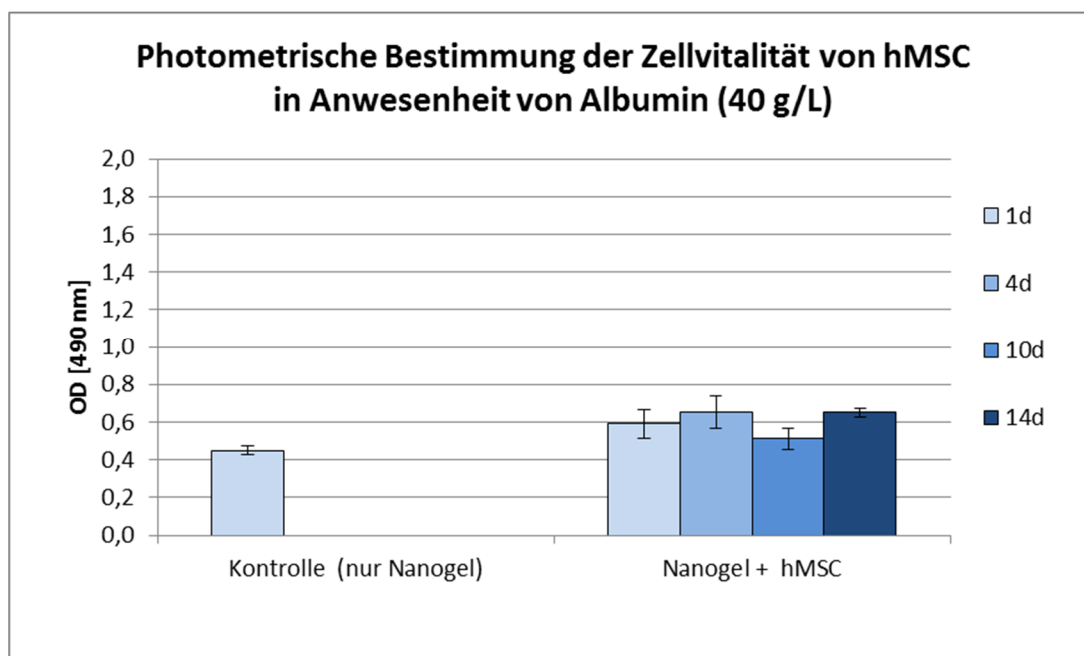


Abbildung 46: Übersicht der Zellvitalität zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten in Anwesenheit von 40 g/L Albumin.

berechnet wurde).

Von insgesamt vier getesteten Spendern zeigten alle Spender- MSCs eine starke Reduktion der Vitalität in Anwesenheit des Nanogel®-Materials. Je höher hierbei die gewählte Nanogel®konzentration war, desto niedriger war die Vitalität der Stammzellen. Spenderabhängig traten hier in der Höhe der Extinktionswerte geringe Schwankungen auf, die beschriebene Tendenz konnte aber bei allen vier Spendern beobachtet werden. Spenderunabhängig kann eine negative Beeinflussung der Zellen durch die Anwesenheit des humanen Albuminmoleküls beobachtet werden. Hier zeigten alle Stammzellpopulationen einen deutlich reduzierten OD- Wert in Anwesenheit von Albumin (ohne Nanogel®zusatz) im Vergleich zu den Nanogel®-unbehandelten Zellen in Standardzellkulturmedium.

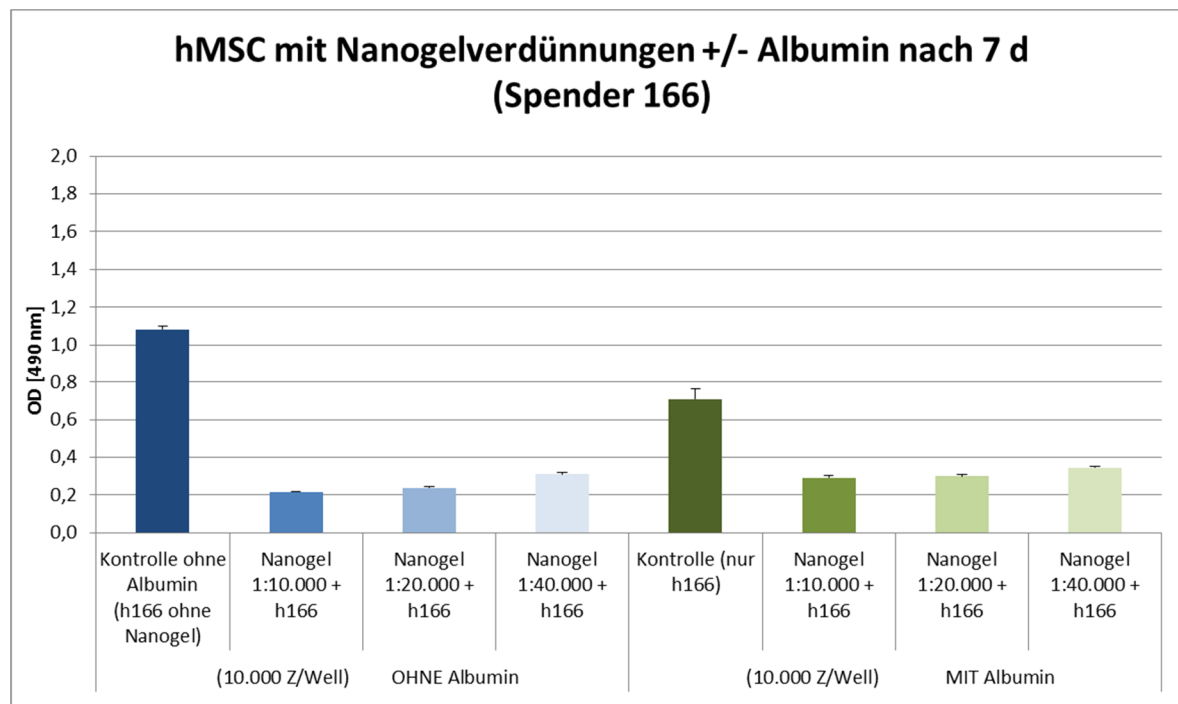


Abbildung 47: Übersicht der Zellvitalität von Spender Nr. 166 nach 7 Tagen Inkubation mit verschiedenen Nanogel®-Verdünnungen in Ab- bzw. Anwesenheit von Albumin.

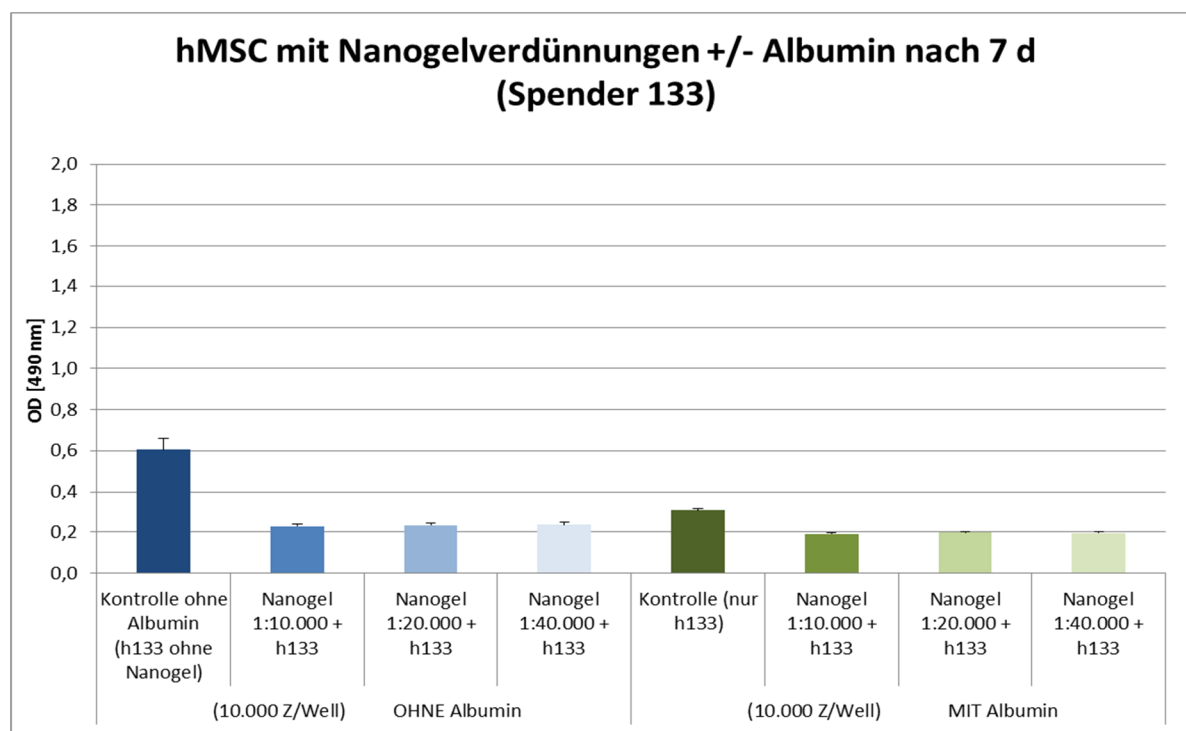


Abbildung 48: Übersicht der Zellvitalität von Spender Nr. 133 nach 7 Tagen Inkubation mit verschiedenen Nanogel®-Verdünnungen in Ab- bzw. Anwesenheit von Albumin.

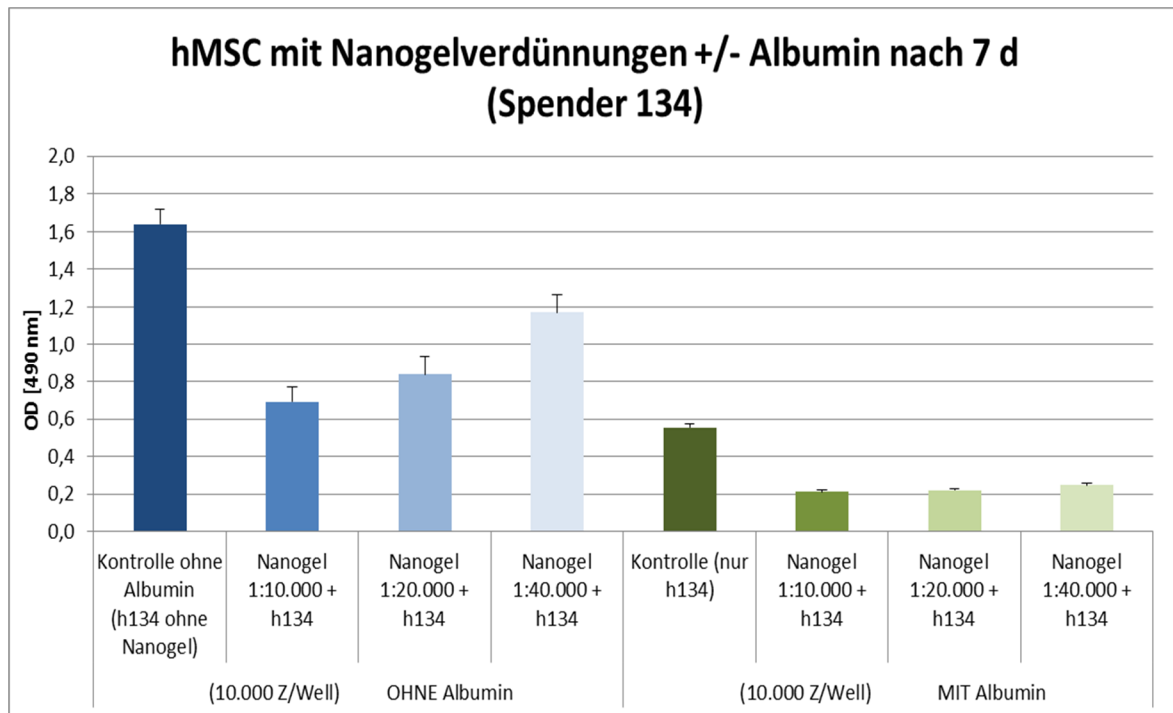


Abbildung 49: Übersicht der Zellvitalität von Spender Nr. 134 nach 7 Tagen Inkubation mit verschiedenen Nanogel®-Verdünnungen in Ab- bzw. Anwesenheit von Albumin.

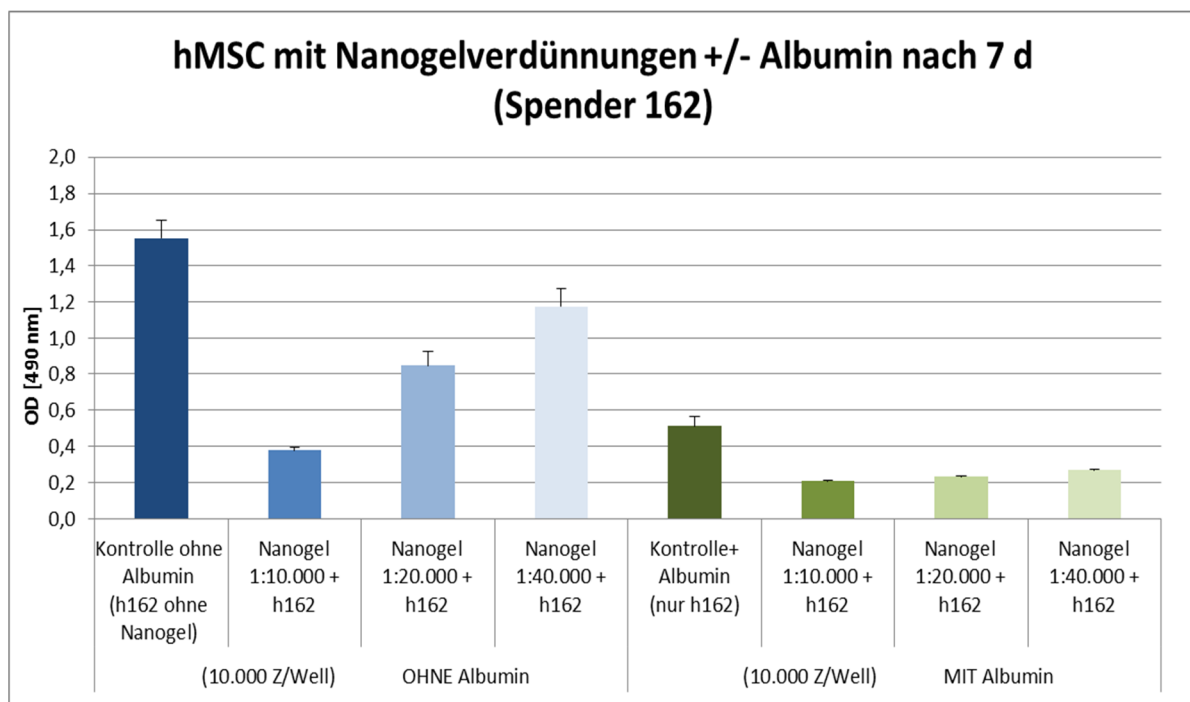


Abbildung 50: Übersicht der Zellvitalität von Spender Nr. 162 nach 7 Tagen Inkubation mit verschiedenen Nanogel®-Verdünnungen in Ab- bzw. Anwesenheit von Albumin.

Auch der Versuch das Nanogel®-Material mit bzw. ohne Vorinkubation in einer Albuminlösung direkt mit humanem Knochenmark zu besiedeln zeigte nach vier Wochen keinerlei Zellvitalität mittels CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (siehe Abbildung 51). Die Extinktionswerte der besiedelten Proben entsprachen in etwa denen der unbesiedelten Nanogel®Kontrollen.

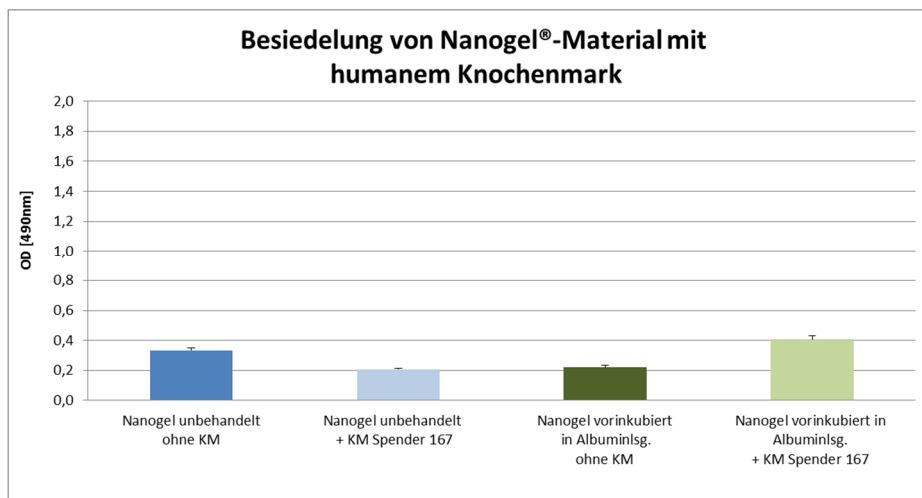


Abbildung 51: Besiedelung des Nanogel®-Materials (mit und ohne Vorinkubation in einer Albuminlg.) mit humanem Knochenmark (n=4).

Um die Toxizität des Nanogel®-Materials zu bestimmen wurde ein Zytotoxizitätsassay (Fa.Promega, Madison, USA) durchgeführt. Die humanen mesenchymalen Zellen wurden in Kulturmedium in Wells ausgesät (10 000 Zellen / Well; Dreifachbestimmung), nach einer Adhärenzphase von 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgenommen und durch das jeweilige Testmedium ersetzt. Nach 5 Tagen erfolgte die photometrische Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität (LDH-Aktivität) vor bzw. nach der Lyse der Zellen. Bei jeder Probe wurde der „Hintergrund“ (d.h. das jeweilige Testmedium ohne Zellen) abgezogen. Mit dem Verhältnis der Farbstoffumsetzung vor zu nach der Lyse der Zellen (maximale LDH

Aktivität) konnte der prozentuale Anteil toter Zellen rechnerisch ermittelt werden. In Abbildung 52 wurde die prozentuale Toxizität der Proben dargestellt. Bereits bei sehr niedrigen Nanogel®konzentrationen (1: 40 000 fach verdünnt) konnte ein deutlich negativer Effekt gegenüber der unbehandelten Negativkontrolle beobachtet werden. Dieser negative Effekt auf die Zellvitalität steigerte sich deutlich je höher die Nanogel®konzentration gewählt wurde.

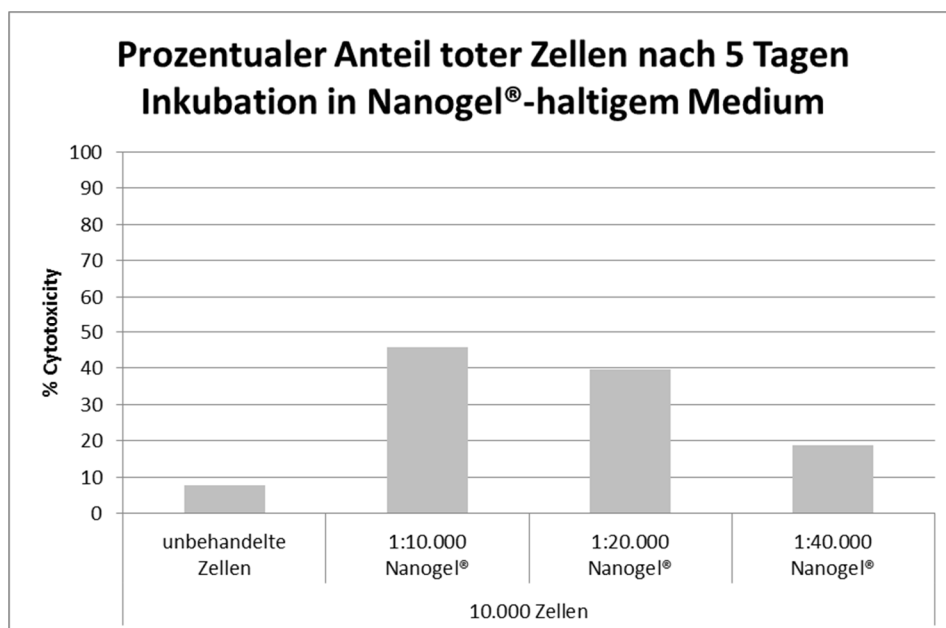


Abbildung 52: Darstellung der Ergebnisse des Zytotoxizitätstest von Zellen mit und ohne Nanogelbehandlung.

Dieser Versuch wurde auch bei höheren Zellkonzentrationen (50 000 bzw. 100 000 Zellen in Dreifachbestimmung) durchgeführt, auch hier konnte der gleiche toxische, konzentrationsabhängige Effekt des Nanogels auf die Zellen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

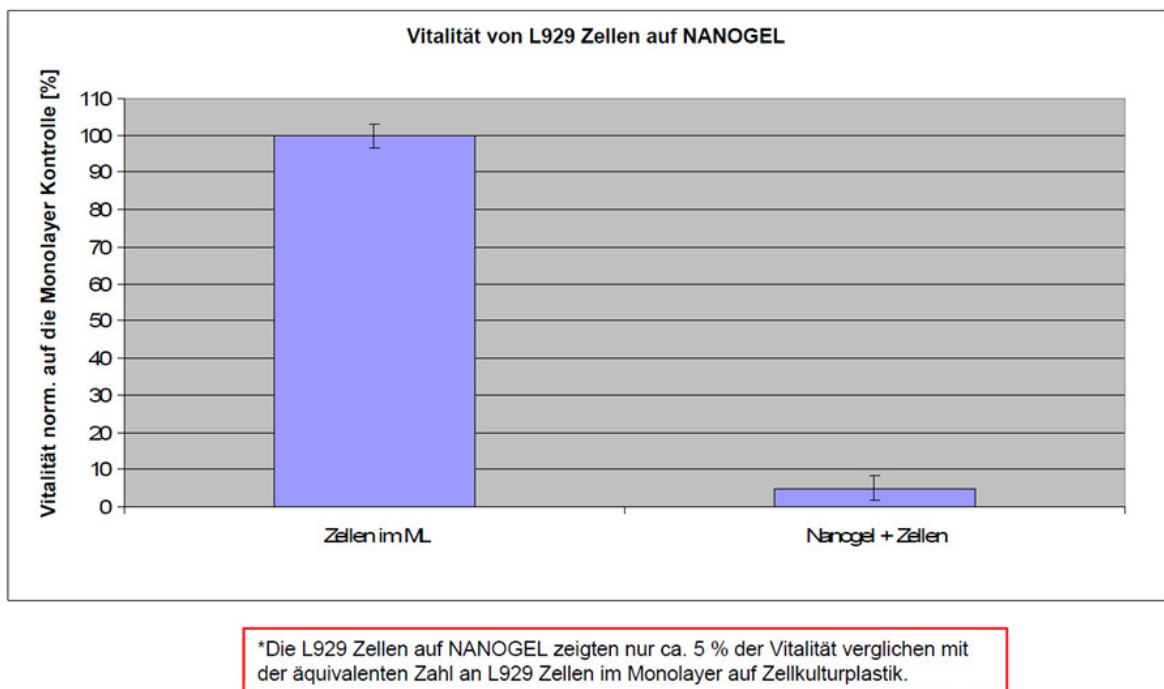


Abbildung 53: Ergebnisse des Zytotoxizitätstest des NMI Reutlingen. Hier wurde das Nanogel® unverdünnt eingesetzt.

Auch der parallel am NMI Reutlingen durchgeführte Toxizitätstest mit L929 Zellen (Fibroblasten, Maus) zeigte einen enormen toxischen Effekt des Nanogel®-Materials auf die Zellen (siehe Abbildung 53). Der Test erfolgte nach den Prüfrichtlinien ISO 10993-5: 1999 „Tests for in vitro cytotoxicity“. Die Zellen, denen unverdünntes Nanogel® zugesetzt wurde, zeigten nur noch eine Vitalität von 5% gegenüber den unbehandelten Monolayer-Zellen (100% vitale Zellen).

Der toxische Effekt des Nanogel®-Materials wurde durch die beiden unabhängig durchgeführten Toxizitätstest bestätigt (siehe Abbildung 52 und Abbildung 53). Ungeklärt war jedoch weiterhin wie die Nanopartikel zu diesem toxischen Effekt führten. In den folgenden Experimenten wurde deshalb untersucht ob es zu einer Aufnahme der Partikel ins Zellinnere kommt. Zunächst wurde ein FACS-Experiment

an zwei Spenderpopulationen durchgeführt, welches die Größe und Granularität der jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen im Vergleich zu den Nanogel® behandelten Proben prüfte.

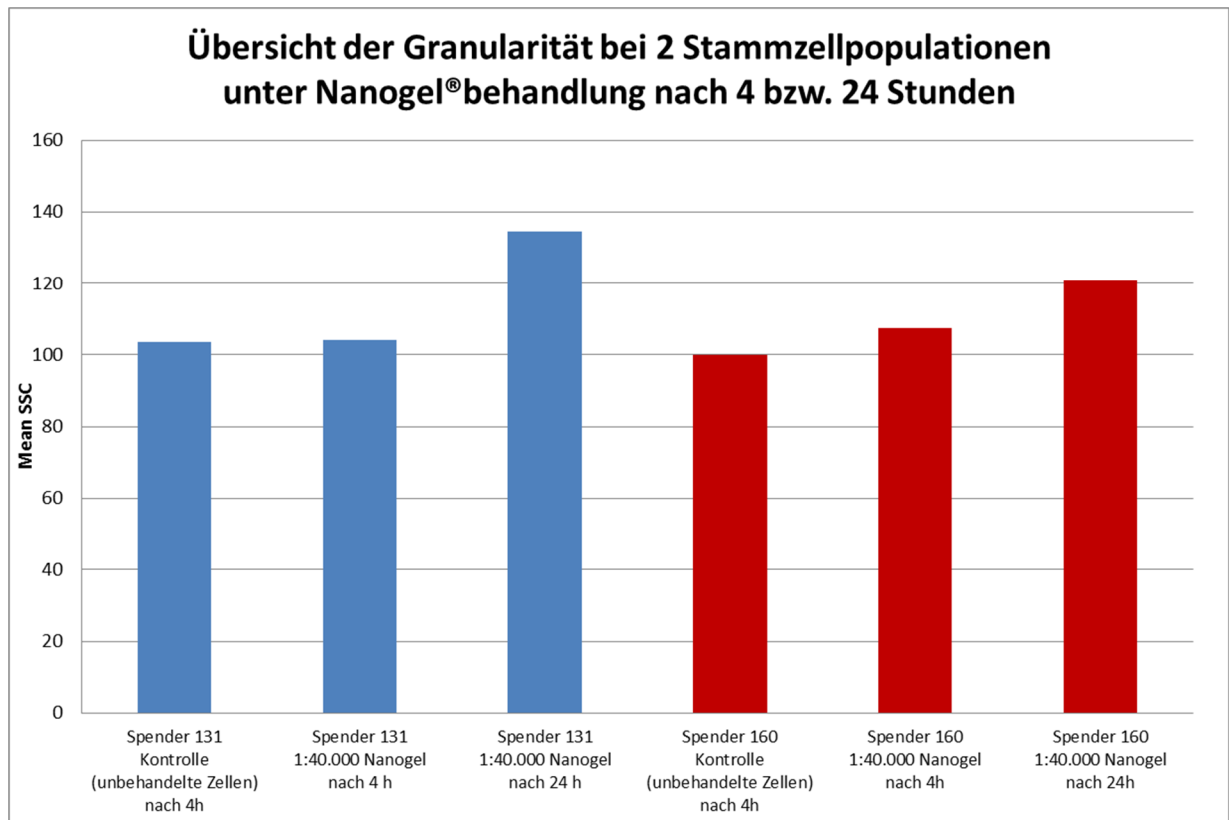


Abbildung 54: Übersicht der Granularität (Mean SSC) bei zwei Stammzellpopulationen unter Nanogel®-Behandlung.

Die unbehandelten Zellen zeigten eine wesentlich geringere Granularität im Vergleich zu den beiden Proben, die mit Nanogel® behandelt wurden (siehe Abbildung 54). Nach 4 Stunden begann die Granularität bei beiden Zellpopulationen zu steigen (Aufnahme der Partikel? Kleben die Partikel an der Membran?) Die höchste Granularität konnte bei beiden Zellpopulationen jeweils nach 24 Stunden Nanogel®-Behandlung detektiert werden.

Es ist jedoch schwierig zu sagen ob sich die Granula ausschließlich an der Außenseite der Zellmembran befinden oder auch innerhalb der Zellen (an der Außenseite konnten sie auch mikroskopisch nachgewiesen werden). Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurde im Weiteren transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (siehe Abbildung 56 bis Abbildung 60).

Auch der Vergleich der Zellgrößen von unbehandelten Zellen vs. Nanogel®-behandelten Zellen nach 4 bzw. 24 Stunden zeigt deutliche Unterschiede (siehe Abbildung 55). Während nach 4 Stunden Nanogel®-Behandlung bei beiden Stammzellpopulationen nur jeweils eine etwas geringere Zellgröße im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle detektiert werden kann, nimmt die Zellgröße nach 24 Stunden bei beiden getesteten Stammzellpopulationen deutlich ab. Dies könnte auf ein Schrumpfen der Zelle durch apoptotische Vorgänge hinweisen.

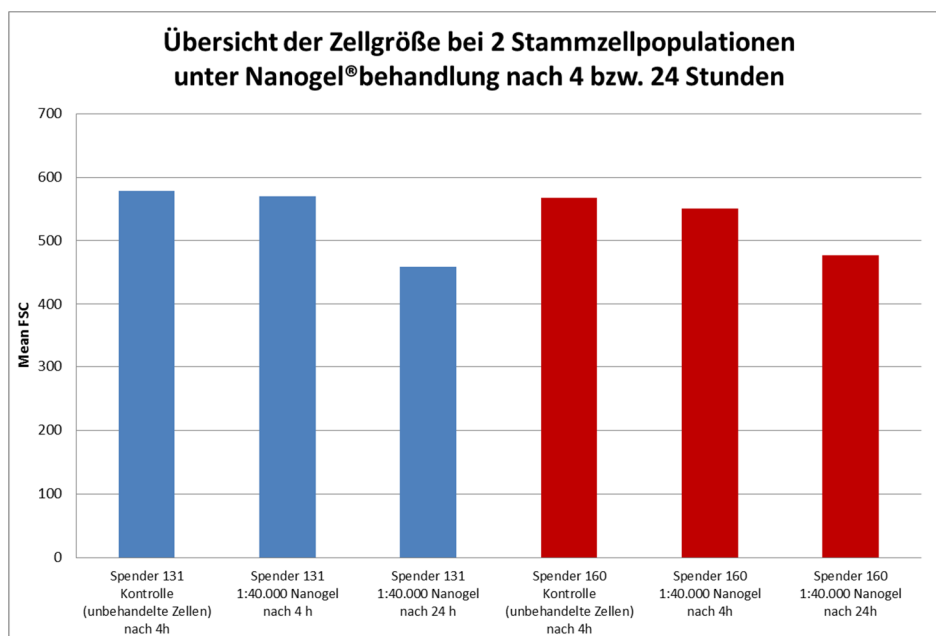


Abbildung 55: Übersicht der Zellgröße (Mean FSC) bei zwei hMSC-Populationen unter Nanogel®-Behandlung.

Albumin als Carrier von Nanopartikel ?

Da in den durchgeführten Experimenten die Stärke des Nanogel®-Effekts oft durch die Anwesenheit des Serumproteins Albumin verstärkt wurde, sollte dessen Rolle ebenfalls mittels transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen geklärt werden. Das Albuminmolekül besitzt zahlreichen Bindestellen, die potentiell geeignet wären um die CaP-Nanopartikel zu binden -sowohl kationische Bindungsstellen wie auch Bindestellen für Ca^{2+} Ionen und Phosphat (Quelle: All about Albumin, T. Peters). Pro Albuminmolekül können 1- 2 Ca^{2+} Ionen gebunden werden (McLean et al., 1934). So könnte ein Transport der Nanopartikel mittels humanem Albumin in das Zellinnere erfolgen.

Für die TEM-Aufnahmen wurden insg. 3 Proben angefertigt.

- 1.) Unbehandelte Zellen
- 2.) Zellen mit 1: 40 000- facher Nanogel®verdünnung im Kulturmedium
- 3.) Zellen mit 1: 40 000- facher Nanogel®verdünnung im Kulturmedium mit Albuminzusatz (40 g/L)

Um ausreichend Zellmaterial für diesen Versuch zu generieren, wurde pro Probe 5 (Probe 1.) bzw. 7 Zellkulturflaschen (Proben 2. und 3.) mit jeweils 225 cm² verwendet. Für den Versuch wurde ein humaner MSC-Pool gewählt (aus 10 verschiedenen MSC Spendern). Die Zellen wurden zunächst in Kulturmedium ohne Nanogel®zusatz ausgesät und kultiviert. Nachdem bei allen Proben eine Konfluenz von ca. 70% erreicht wurde, erfolgte die Zugabe des jeweiligen Testmediums. Nach

einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurde der Überstand aus den Flaschen abgezogen und jede Zellkulturflasche zweimal mit jeweils 50 ml vorgewärmter PBS-Lösung gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Trypsinierung der Zellen (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L Versene®, 5 Minuten, 37 °C). Die abgelösten Zellen wurden in PBS Lösung aufgenommen, gezählt und anschließend in gepufferter 4%-iger Formalinlösung fixiert (1 Stunde, auf Eis). Nach der Fixierung wurden die Zellen wie unter 1.26 beschrieben für die TEM-Aufnahmen behandelt.

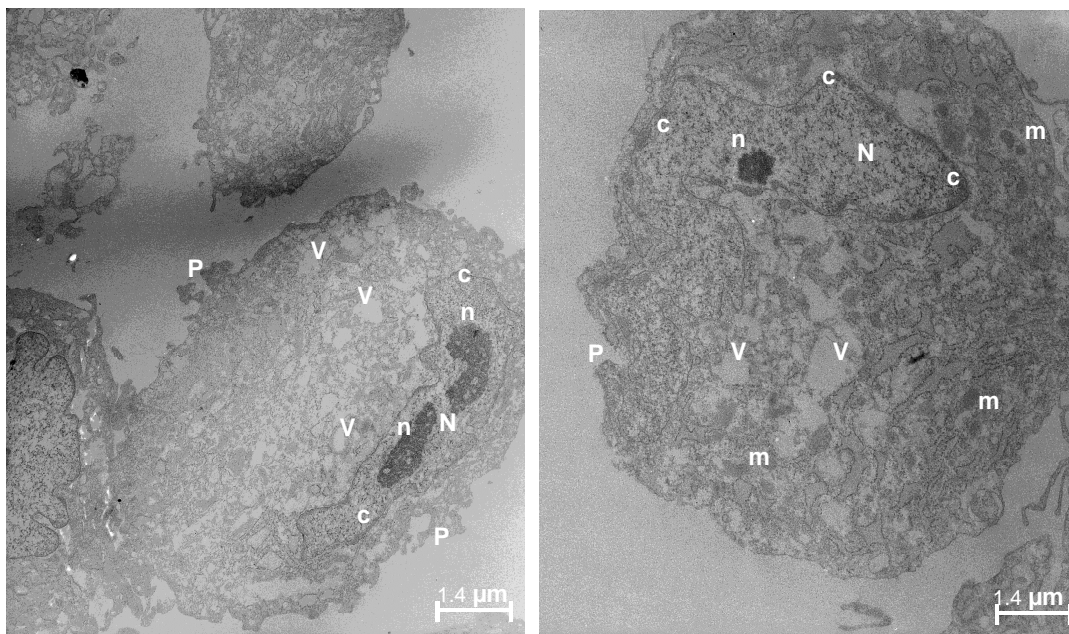


Abbildung 56: TEM-Aufnahmen der Kontrollzellen ohne Nanopartikel (5000-fache Vergrößerung).

In Abbildung 56 werden zwei Kontrollzellen gezeigt, diese wurden ohne Nanogel®Zusatz kultiviert. Der Zellkern (N) war klar zu erkennen und war -wie in der Literatur- beschrieben nicht zentral angeordnet und unregelmäßig geformt (Tan, Ahmad, Selvaratnam, & Kamarul, 2013). Im Zellkern konnte man ein bis mehrere Nucleoli (n) finden, auch Vakuolen (V) und Mitochondrien (m) waren intrazellulär sichtbar (hier wurden nur wenige exemplarisch dargestellt). Chromatin formte eine

dichte, sehr dünne Schicht rund um den Zellkern (perinukleär). Entlang der äußeren Plasmamembran wurden viele Pseudopodien (P) ausgebildet. Wurden die Zellen hingegen in Anwesenheit von Nanogel® kultiviert konnte man intrazelluläre dunkle, dichte, stäbchenförmige Partikel (NA) erkennen (siehe Abbildung 57). Außerhalb der Zellen waren die Nanopartikel tlw. zu großen Komplexen (K) aggregiert. Bei diesen handelte es sich wahrscheinlich um diejenigen, die bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen beobachtet und beschrieben wurden (siehe Abbildung 43).

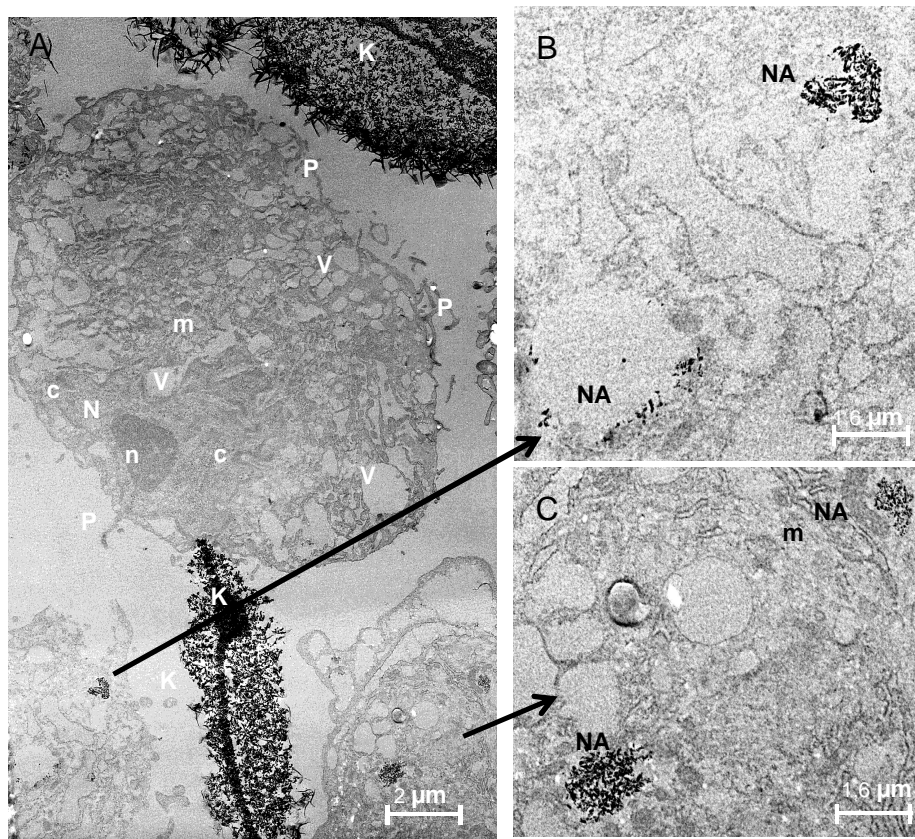


Abbildung 57: A: TEM-Aufnahmen der Nanogel®-behandelten Zellen bei einer Verdünnung von 1:40 000 (Vergrößerung 3150x). B und C: Vergrößerter Ausschnitt von Bild A. Nanopartikel sind markiert (NA)

Auch innerhalb der Zellen, welchen eine physiologische Konzentration des Serumproteins Albumin zugesetzt wurde, konnten dunkle, stäbchenförmige Partikel nachgewiesen werden (siehe Abbildung 58).

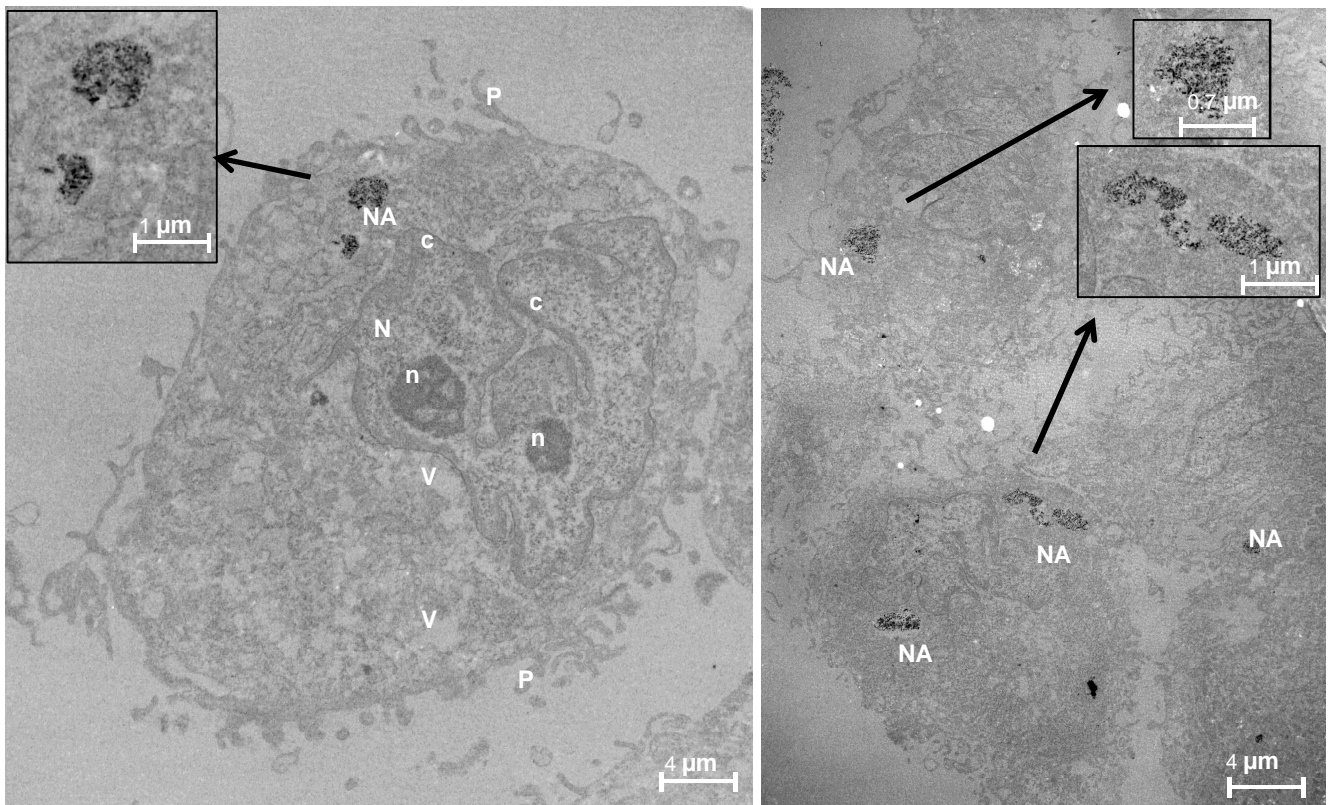


Abbildung 58: TEM-Aufnahmen einer hMSC (2500-fache Vergrößerung) mit 1: 40 000-facher Nanogel®-Verdünnung und einer physiologischen Albuminkonzentration im Medium (40 g/L). Ausschnitte der Nanopartikel-Ansammlung innerhalb der Zellen wurden vergrößert dargestellt.

Da in Abbildung 56 bis Abbildung 58 der Kontrast der zellulären Organellen und des Kerns nur relativ schwach dargestellt werden konnte, wurde eine Nachkontrastierung der Proben durchgeführt (siehe 1.26). Hierfür wurden Uranylacetat- und Blei-Citrat – Lösung verwendet. In den folgenden nachkontrastierten Bildern (Abbildung 59 bis Abbildung 61) sind vor allem die Chromatinstrukturen, die Nukleoli des Zellkerns sowie die Mitochondrien weitaus deutlicher erkennbar.

Nachkontrastierte TEM-Proben

Die Nachkontrastierung der Proben erfolgte wie unter 1.26 beschrieben. Die folgende Abbildung 59 zeigt eine Kontrollzelle, die nicht mit Nanogel® behandelt wurde. Die

zellulären Strukturen wie Mitochondrien sind nach der Nachkontrastierung klar sichtbar. Auch die Chromatinstruktur rund um den Zellkern sowie die Nukleoli (n) sind besser kontrastiert wie in der entsprechenden nicht-kontrastierten Probe (vergleiche Abbildung 56).



Abbildung 59: TEM-Aufnahme einer nachkontrastierten hMSC-Zelle ohne Nanogel®-Behandlung (4000-fache Vergrößerung).

In der Nanogel® behandelten Probe (ohne Albuminzusatz) konnte man entlang der äußeren Zellmembran eine dichte, dicke Schicht an Nanogel®-Aggregaten (siehe Abbildung 60) erkennen. Die langen, stäbchenförmigen Partikel verteilten sich rund um den Zellkörper, so dass die niedrige proliferative Aktivität der Nanogel® behandelten Zellen wahrscheinlich auf einer mechanischen Hinderung der Nanogel®-Partikel während der Mitose beruht. Die Nanogel®-Partikel, welche intrazellulär aufgenommen wurden, scheinen aber auch einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation bzw. Zellvitalität zu haben. Dies zeigten die Zellproben, die zusätzlich zum Nanogel®-Zusatz auch in Anwesenheit von Albumin kultiviert wurden.

Diese Zellen hatten an ihrer Außenmembran keine Schicht an Nanogel®-Aggregaten. Das Ankleben großer Nanogel®-Aggregate (K) an die äußere Zellmembran konnte ausschließlich in der Probe ohne Albuminzusatz beobachtet werden. In Anwesenheit des Serumproteins Albumin, konnte man die Nanopartikel innerhalb der Zellen nachweisen (NA), es fand jedoch keine Bindung an die Zellmembran in Form großer Nanoaggregate (K) statt (siehe Abbildung 61). Es kam in diesem Fall vermutlich auch zu einer Bindung des Albuminmoleküls an die Kalziumphosphat-Nanopartikel - diese Bindung zwischen Kalziumphosphat und Albumin wurde auch durch andere Forschungsgruppen bereits beschrieben (Mavropoulos et al., 2011; Zeng et al., 1999).

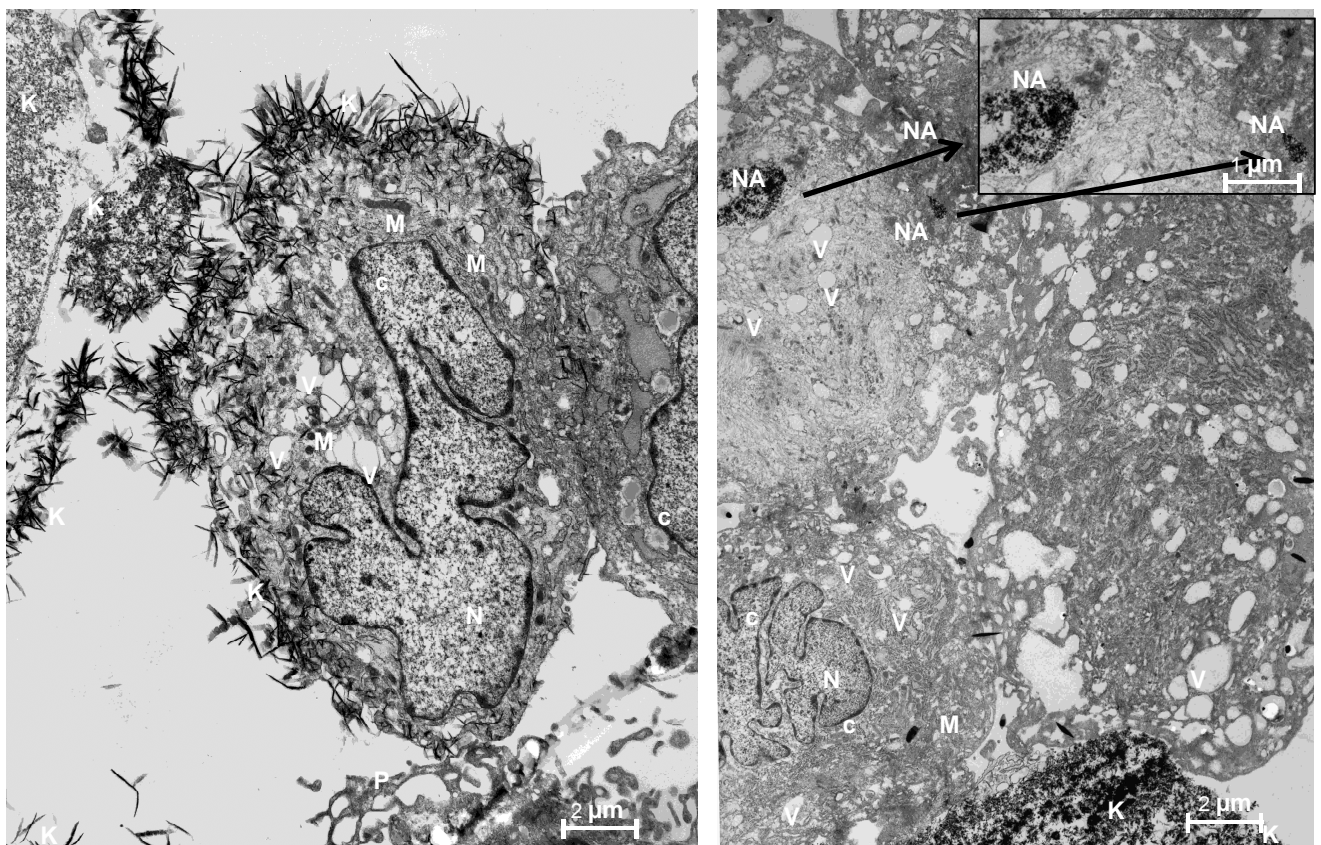


Abbildung 60 : TEM-Aufnahmen (4000 fache Vergrößerung) der hMSC mit 1: 40 000 facher Nanogel®-Verdünnung im Kulturmedium.

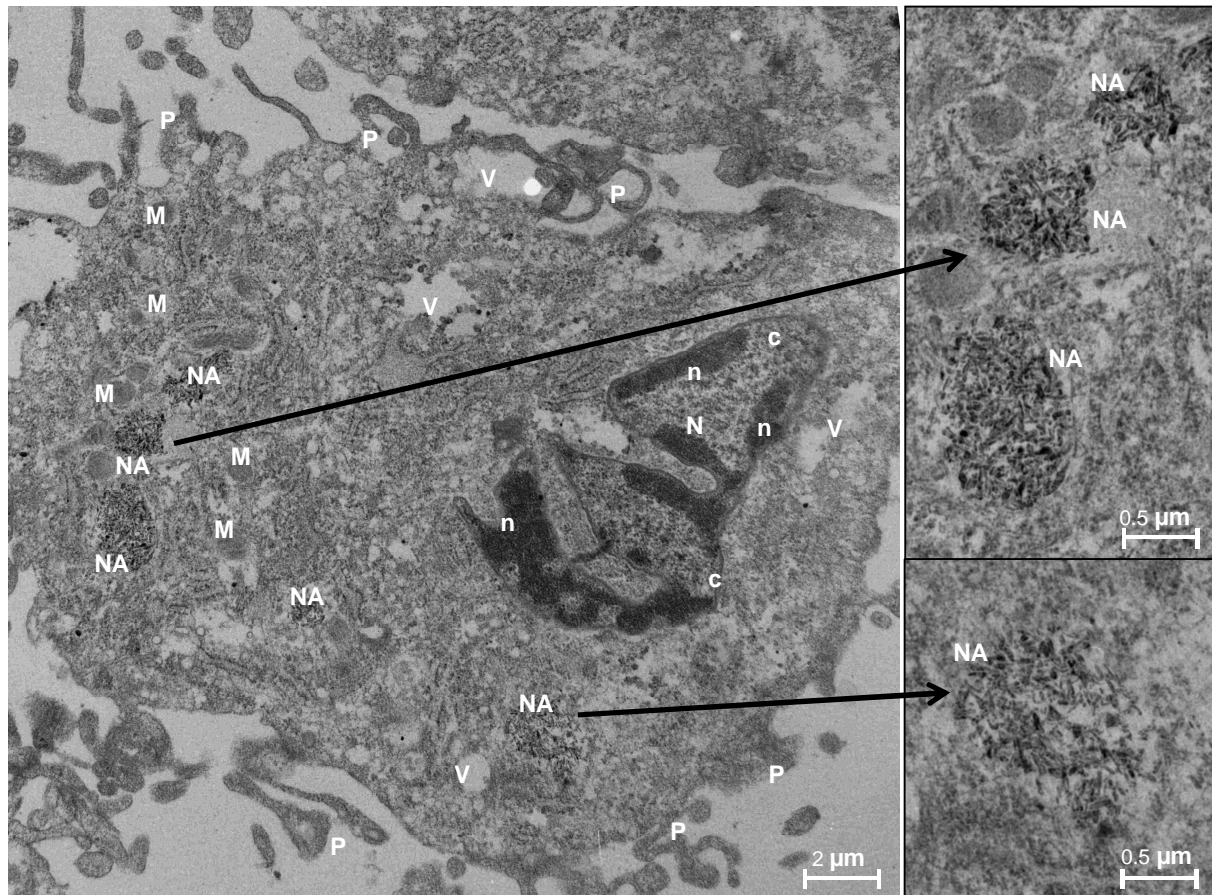


Abbildung 61: Nachkontrastierte TEM-Aufnahme (6300 fache Vergrößerung) einer hMSC mit 1: 40 000 facher Nanogel®-Verdünnung im Kulturmedium mit Albuminzusatz.

In Abbildung 61 wird eine Zelle gezeigt, die in albuminhaltigem Medium in Anwesenheit von Nanogel® kultiviert wurde (1: 40 000 Verdünnung). Durch die Nachkontrastierung der Proben konnten die Mitochondrien (M) , die Kernhülle (c) und die Nukleoli (n) besser sichtbar gemacht werden, durch den höheren Anteil an kontrastierten Organellen war es jedoch schwieriger die zahlreichen intrazellulären Nanogel®-Partikeln (NA) wahrzunehmen. Die Partikel wurden deshalb in Abbildung 61 in den beiden rechten Bildern nochmals vergrößert dargestellt.

1.37.3 Hydroxylapatit-Partikel (HA-Partikel)

Bei den Hydroxylapatit-Partikeln handelt es sich um das Basismaterial für die Synthese von Knochenersatzmaterialien (Größe ca. 80-200 μm). Laut Hersteller besitzt das Material bioaktive und biokompatible Eigenschaften. Zunächst wurde die Biokompatibilität des Materials überprüft. Hierfür wurden humane MSC auf die HA-Partikel aufgebracht (sowohl direkt im Well wie auch in einem Insert-System) und nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten ein CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay durchgeführt. Die gemessenen OD-Werte wurden graphisch in Abbildung 62 und Abbildung 63 dargestellt.

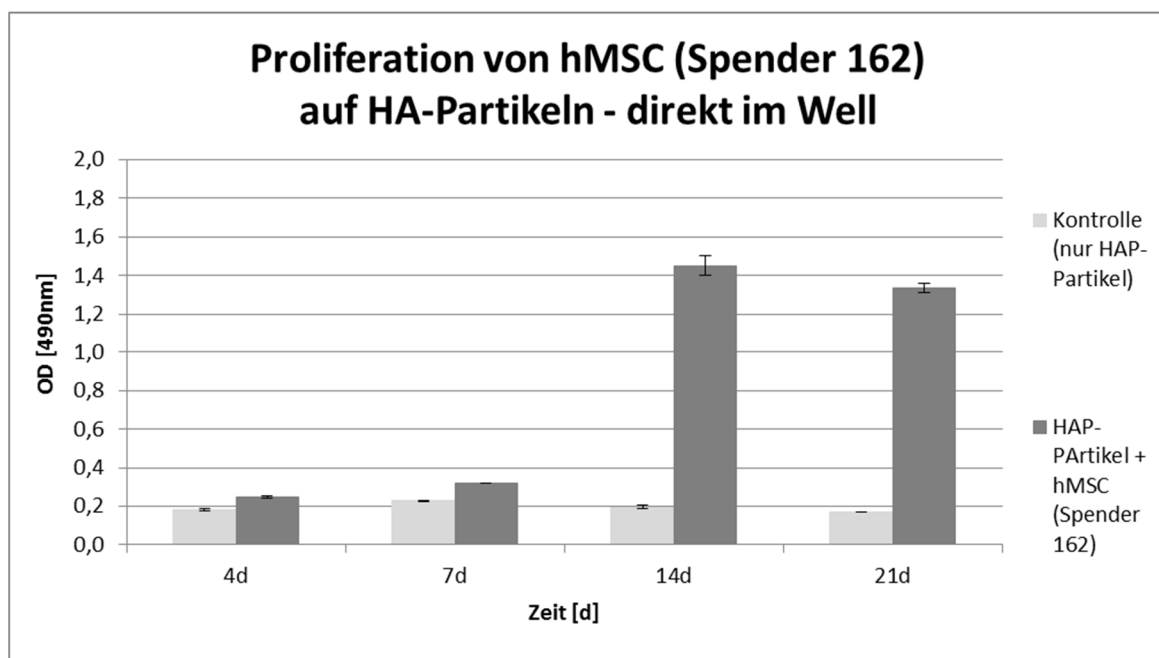


Abbildung 62: Proliferationskinetik hMSC (Spender 162) auf HA-Partikeln zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten (n=3). Hier fand die Kultivierung der Zellen auf HA-Partikeln direkt in einem Zellkulturwell statt.

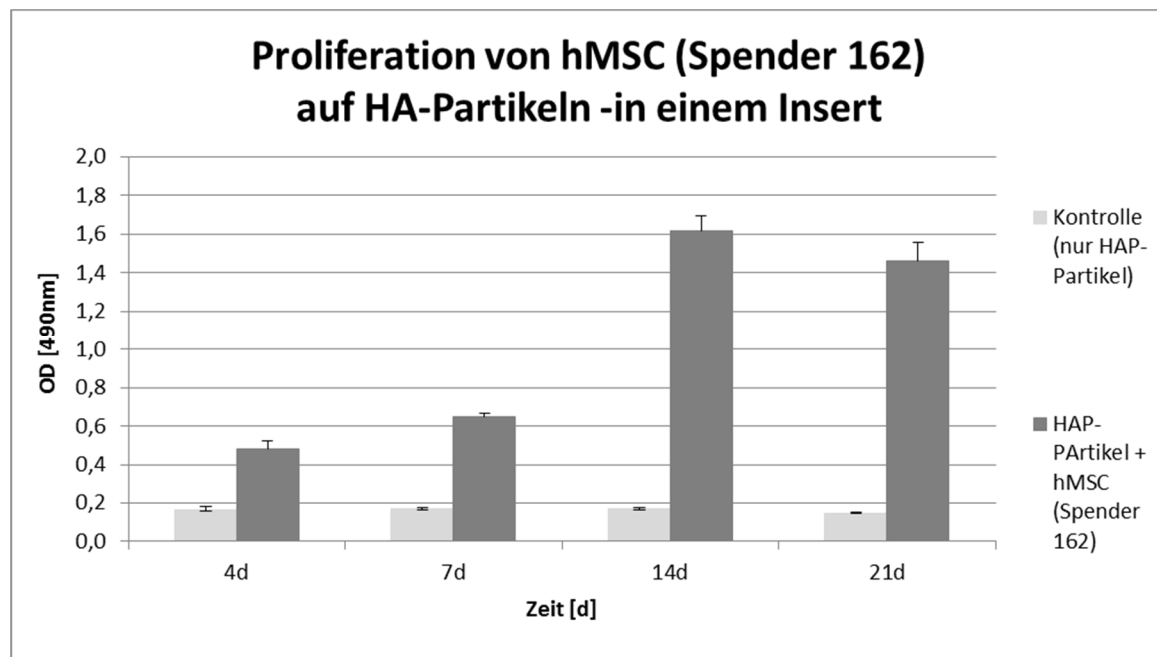


Abbildung 63: Proliferationskinetik hMSC (Spender 162) auf HA-Partikeln zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten (n=3). Hier fand die Kultivierung der Zellen auf HA-Partikeln in einem Insert statt.

Bei den besiedelten HA-Partikeln stieg, in beiden Kultivierungssystemen, der OD-Wert im zeitlichen Verlauf des Experiments an. Ab Tag 14 sank dieser Wert jedoch leicht ab, was wahrscheinlich auf eine vollständige Besiedelung der HA-Partikel mit Zellen zurückzuführen war. Der OD-Wert nach 4 Tagen war bei den in den Inserts kultivierten HA-Partikeln deutlich höher wie im Well-System, was auf eine effizientere Besiedelung schließen lässt. Zudem konnte man im Well-System auch durch die regelmäßigen Medienwechsel geringe Verluste an HA-Partikeln nicht verhindern da diese aufgrund ihrer geringen Größe bzw. des minimalen Gewichts leicht durch den Sog der Stabpipette entfernt wurden.

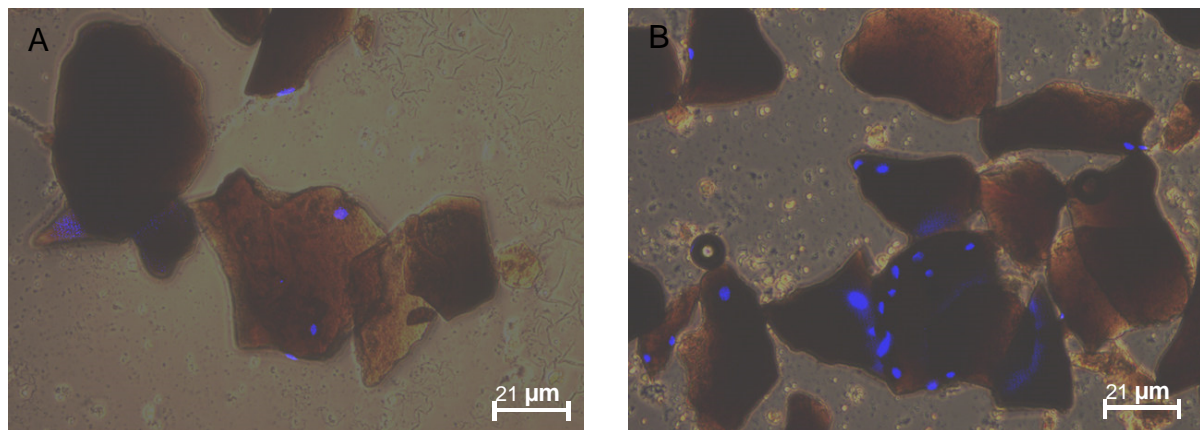


Abbildung 64: Überlagerungsaufnahmen Durchlicht/Fluoreszenz (DAPI) bei 100-facher Vergrößerung von HA-Partikeln nach A: 14 Tagen und B: 21 Tagen Besiedelungszeit.

Für Abbildung 65 wurden jeweils eine definierte Anzahl von Zellen pro Well ausgesät (6-fach Bestimmung), anhand der gemessenen OD-Werten (Mittelwerte) konnte die Formel $y = 2E-05x$ ermittelt werden. Diese wurde für die Bestimmung der Zellzahlen auf den HA-Partikeln verwendet.

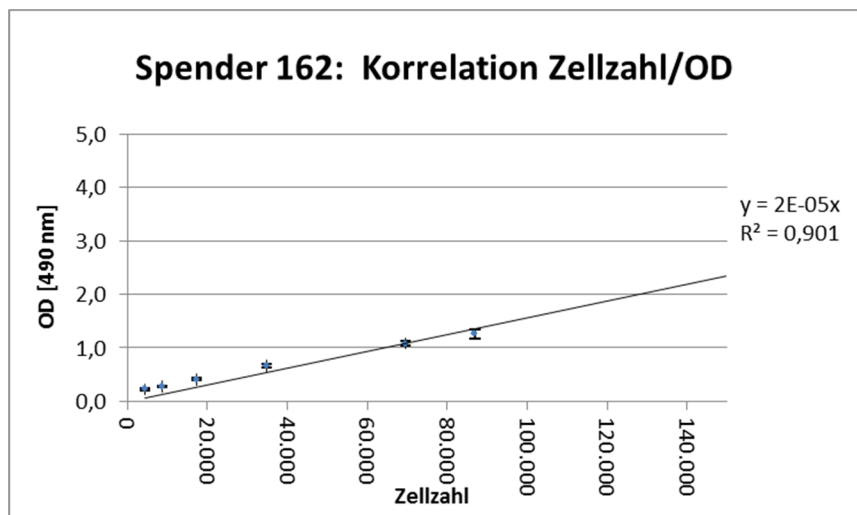


Abbildung 65: Korrelation der Optischen Dichte bei definierten Zellzahlen. n=6

Hierfür wurden die gemessenen OD-Werte nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten in die Formel eingesetzt und so rechnerisch die absolute

Zellzahl ermittelt (siehe Tabelle 30 und Tabelle 31).

Tabelle 30: Berechnung der absoluten Zellzahlen auf HA-Partikeln im Insert-System.

Proben Tage	Kontrolle im Insert	Berechneter Background Insert (HA-P ohne Zellen)	HA- Partikel + Spender 162	Berechnete Zellzahl Probe	Zellzahl absolut (minus Background)
4d	0,166	8300	0,483	24167	15867
7d	0,170	8483	0,648	32400	23917
14d	0,173	8633	1,616	80817	72183
21d	0,145	7233	1,465	73225	65992

Tabelle 31: Berechnung der absoluten Zellzahlen auf HA-Partikeln direkt im Well.

Proben Tage	Kontrolle im Well	Berechneter Background Well (HA-P ohne Zellen)	HA- Partikel + Spender 162	Berechnete Zellzahl Probe	Zellzahl absolut (minus Background)
4d	0,183	9150	0,246	12300	3150
7d	0,228	11417	0,319	15933	4517
14d	0,196	9800	1,452	72583	62783
21d	0,171	8550	1,334	66717	58167

Die berechneten Zellzahlen der beiden Systeme unterschieden sich in ihren absoluten Werten nur minimal. Das Insert-System hatte gegenüber dem Well-System den entscheidenden Vorteil, dass das Handling v. a. während Medienwechsel weitaus einfacher durchzuführen war. Nach Abschluss der Proliferationsexperimente

zeigte sich, dass die humanen Stammzellen das HA-Material gut akzeptierten und ein ausgezeichnetes Wachstumsverhalten auf dem Material aufwiesen.

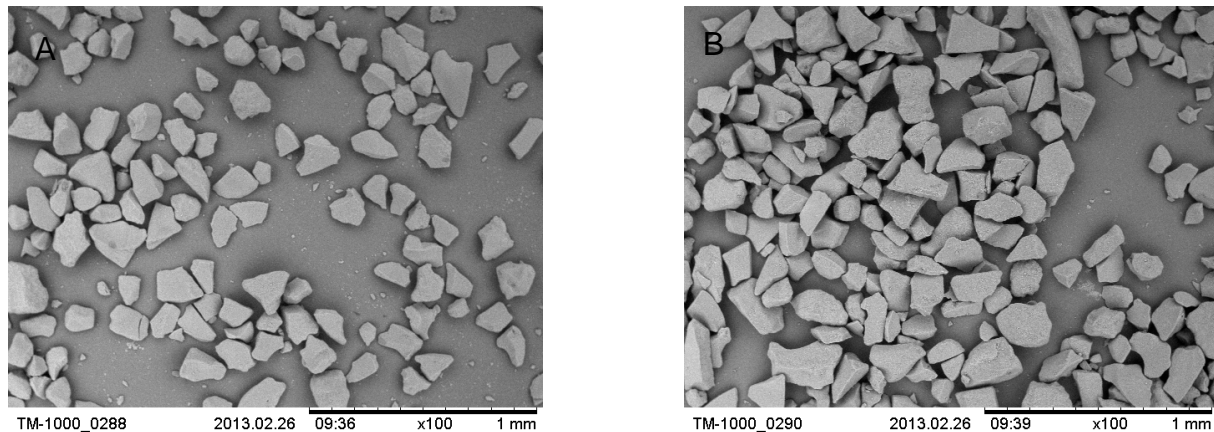


Abbildung 66 : Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von HA-Partikeln bei 100-facher Vergrößerung. A: unbesiedelt B: zellbesiedelt

1.37.4 TriHA+-Würfel

Nach der statischen Besiedelung der TriHA+- Würfel (Fa. Teknimed) wurden die besiedelten Trägermaterialien auf ihre Zellkompatibilität und die Zellverteilung im Material untersucht außerdem wurde eine Proliferationskinetik erstellt. Für die folgenden Versuche wurden jeweils 20 TriHA+ Würfel mit einer Zellzahl von 500 000 Zellen (Osteosarkoma-Zellen) besiedelt und nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten mit einer DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid) bzw. mit Kristallviolettlösung gefärbt. Der DAPI-Farbstoff lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich (blau). Kristallviolett ist ein basischer Farbstoff, welcher vorwiegend an DNA-assoziierte Nukleoproteine bindet. Bei dieser

Färbung wurden die Trägermaterialien vorsichtig mit verdünntem Kristallviolettfarbstoff (0,4%-ig in 4% Formalin) überschichtet und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Trägermaterialien vorsichtig mit PBS gewaschen. Abbildung 67 zeigt eine Übersicht fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten.

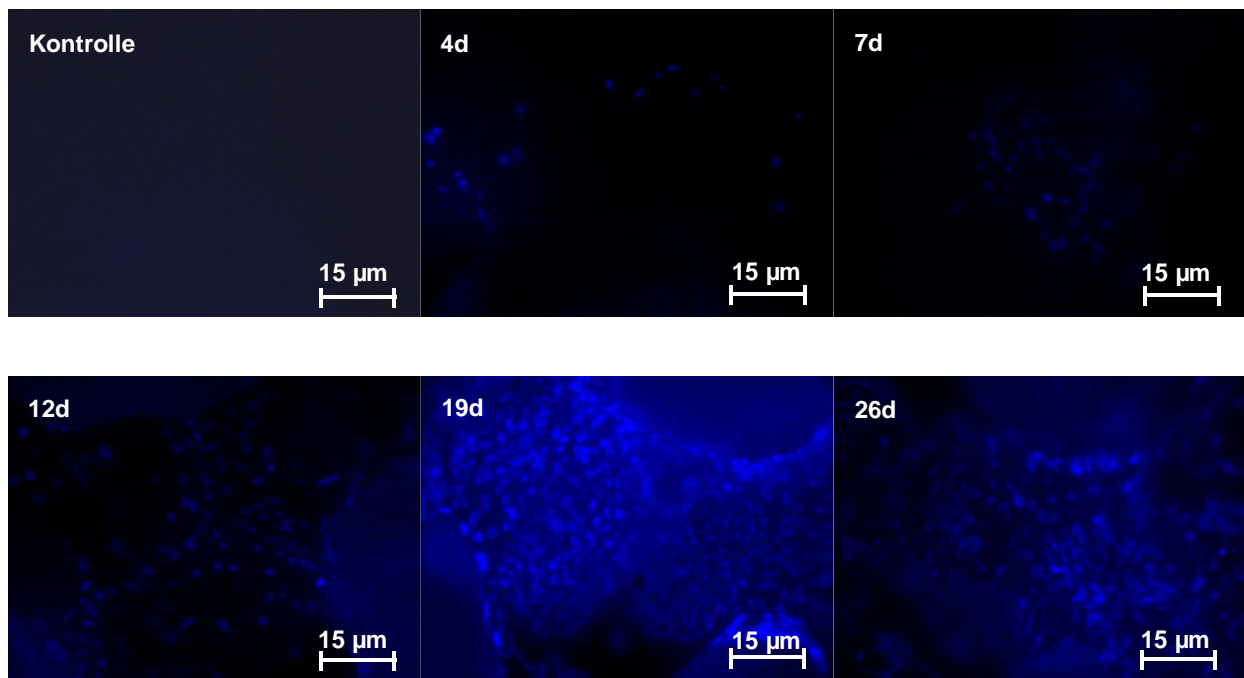


Abbildung 67: Übersicht der DAPI gefärbten, besiedelten TriHA+-Würfel zu verschiedenen Zeitpunkten bei 100-facher Vergrößerung.

Es kommt bis zum Tag 19 zu einer deutlichen Zunahme an Zellkernen über den Inkubationszeitraum, danach fällt dieser Wert wieder etwas ab.

Analog zu den DAPI- Proben kann auch bei den Kristallviolett gefärbten TriHA+-Würfeln eine Zunahme der Zellzahl über den Inkubationszeitraum beobachtet werden (siehe Abbildung 68).

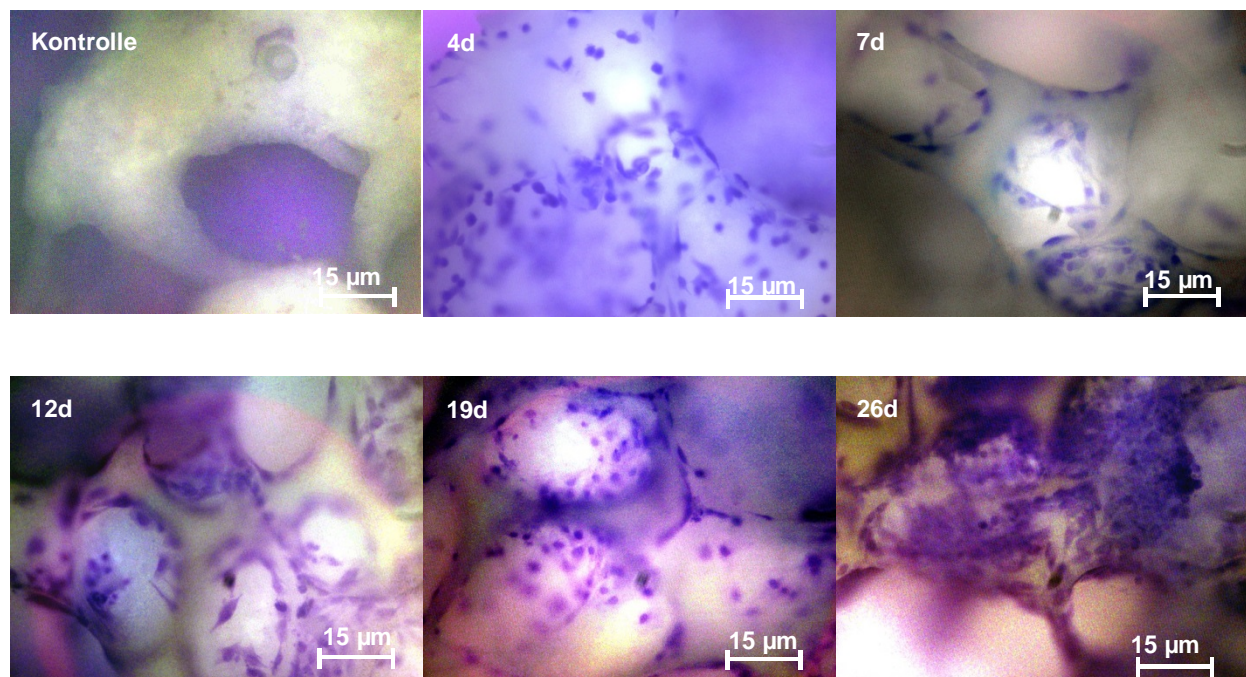


Abbildung 68: Übersicht der Kristallviolett gefärbten, besiedelten TriHA+-Würfel zu verschiedenen Zeitpunkten bei 100-facher Vergrößerung.

Die Zellen zeigen eine „normale“ Zellmorphologie mit breitem flachem Zellkörper und vielen Zellfortsätzen.

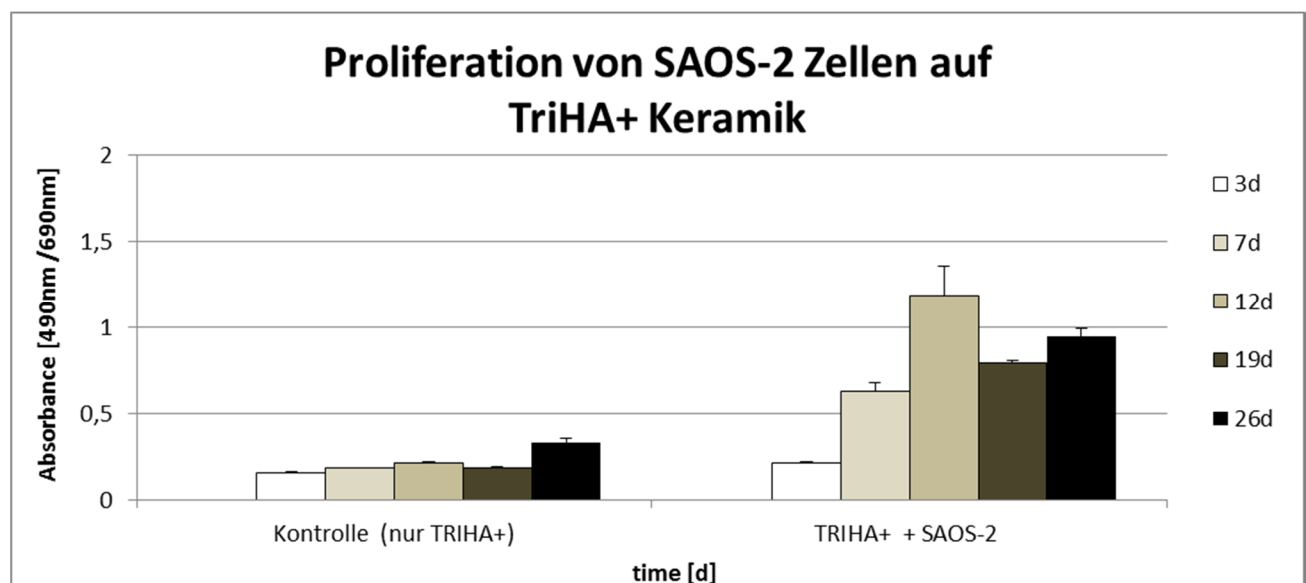


Abbildung 69: Proliferationskinetik der SAOS-2 Zellen auf den TriHA+-Keramiken. Links: Übersicht der Extinktionswerte der unbesiedelten TriHA+-Keramiken (n=3). Rechts: Extinktionswerte der besiedelten Materialstücke zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten (n=6).

Für die in Abbildung 69 dargestellten Mittelwerte wurden für die Kontrollen (ohne Zellen) jeweils drei Materialstücke getestet, für die besiedelten Keramiken 6 Materialstücke.

Wie man Abbildung 70 entnehmen kann, war die Besiedelung des TriHA+-Materials mit humanem Knochenmark (n= 6) erfolgreich, nach 4 Wochen zeigten sich hohe Absorptionswerte welche direkt mit einer hohen Anzahl vitaler Zellen korreliert.

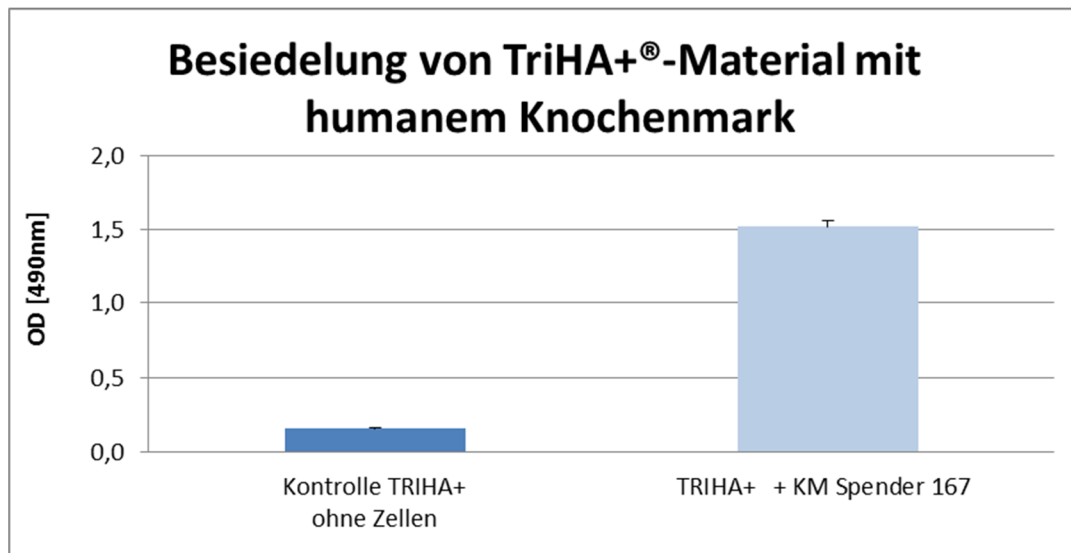


Abbildung 70: Besiedelung des TriHA+®-Materials mit humanem Knochenmark (n=6).

REM-Aufnahmen

Zur Darstellung der Materialmikrostruktur sowie der Besiedelungseffizienz mit Stammzellen wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. In Abbildung 71 wurden REM-Bilder von TriHA+-Würfeln mit und ohne Zellbesiedelung angefertigt. Bild A zeigt einen unbesiedelten Würfel, die poröse Struktur war deutlich sichtbar, die Materialoberfläche wirkte homogen. Im Gegensatz dazu war die

Oberfläche beim zellbesiedelten TriHA+-Würfel in Abbildung 71 Bild B deutlich inhomogener.

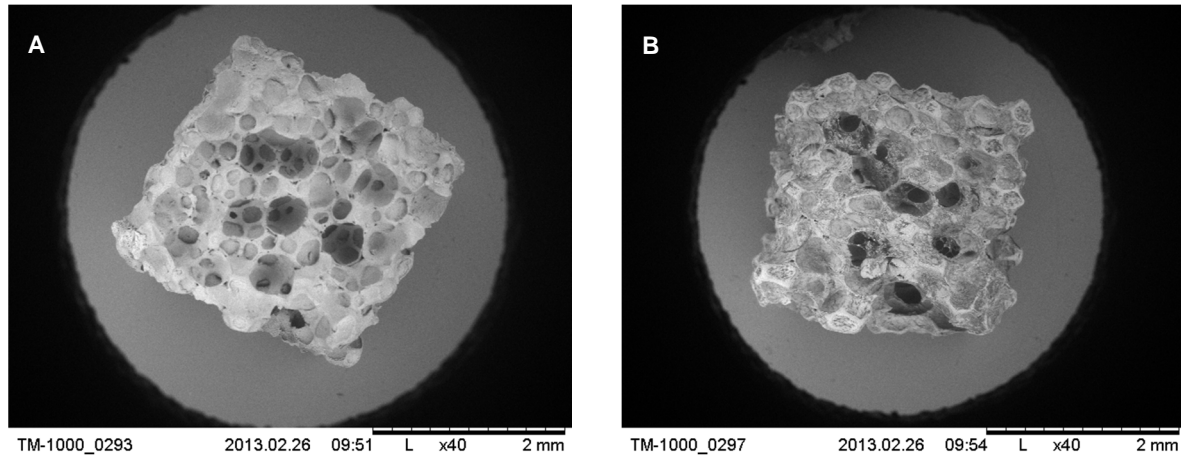


Abbildung 71: REM-Aufnahme TriHA+-Keramik 40-fache Vergrößerung. A: unbesiedeltes Material; B: besiedelter TriHA+-Würfel.

In Abbildung 72 wurden die beiden Proben bei 100-facher Vergrößerung dargestellt (Bild A unbesiedelt, Bild B: besiedelter Würfel). Hier kann man in Bild B die Zellkörper bzw. Zellfortsätze besser erkennen. Die Zellen scheinen homogen über das gesamte Material verteilt zu sein.

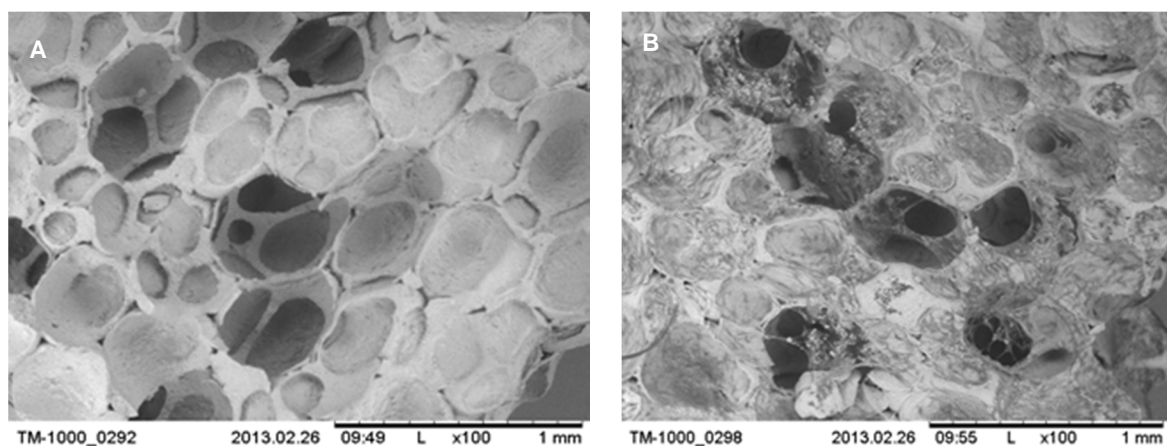


Abbildung 72: REM-Aufnahmen TriHA+. Linkes Bild: unbesiedelter TriHA+ Würfel (100-fache Vergrößerung). Rechtes Bild: Besiedelter TriHA+-Würfel (100-fache Vergrößerung).

Abbildung 73 zeigt eine vergrößerte Darstellung (200-fache Vergrößerung) des besiedelten TriHA+-Würfels. Hier können die Zellen bzw. Zellfortsätze sehr gut erkannt werden. Die Zellen überbrücken z.T. die Poren durch die Ausbildung langer Fortsätze.

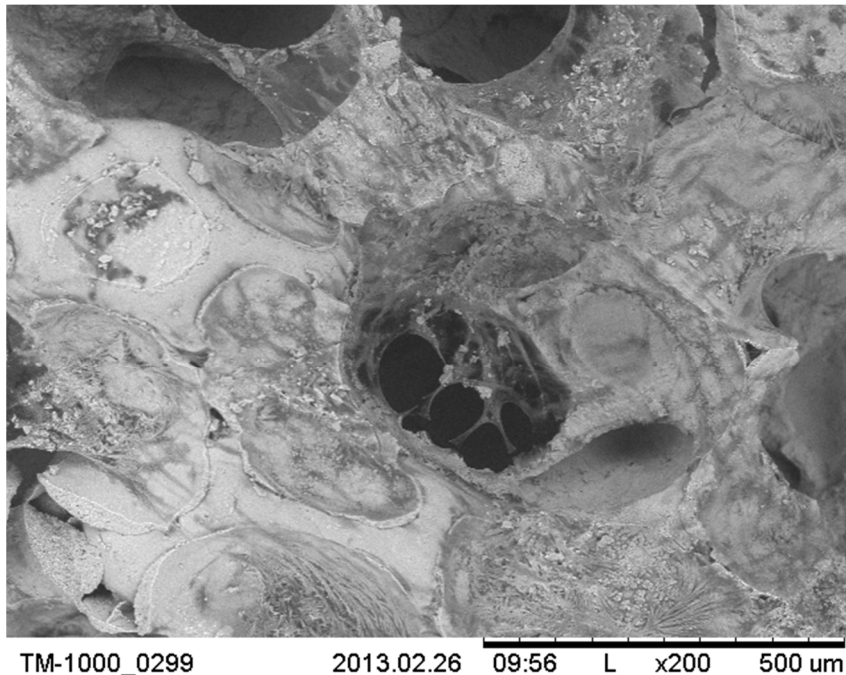


Abbildung 73: REM-Aufnahme eines besiedelten TriHA+ Würfels bei 200 facher Vergrößerung.

Aus den Aufnahmen wird nicht ersichtlich ob diese homogene Zellverteilung bis in das Materialinnere stattfand d.h. ob ein stark vernetztes Porensystem vorhanden war. Um dies zu testen wurden die TriHA+-Würfel mechanisch zerstört und die Fragmente untersucht (siehe Abbildung 74). Hier konnte man in sämtlichen Teilstücken die inhomogene Struktur der Zellen beobachten. Dies zeigt, dass die Zellbesiedelung bis ins Materialinnere stattfand bzw. ein Einwachsen der Zellen ins Materialinnere erfolgen konnte.

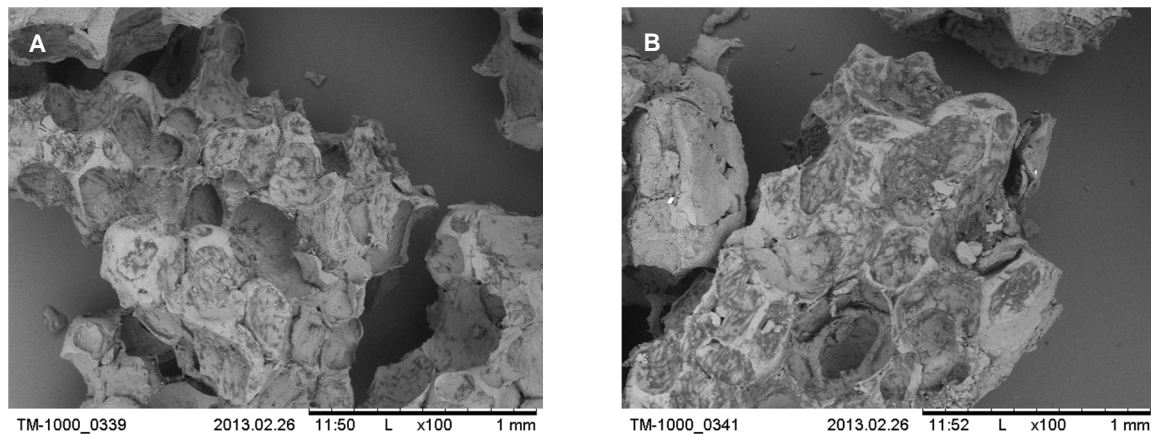


Abbildung 74: REM-Aufnahmen eines zertrümmerten TriHA+-Würfels (100-fache Vergrößerung). Auch innenliegende Teile des Würfels sind gleichmäßig mit Zellen besiedelt.

Das TriHA+-Material zeigt damit nicht nur eine ausgezeichnete Proliferation und Vitalität der Zellen (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) sondern auch eine einheitliche Verteilung der Zellen im gesamten Material.

1.37.5 CeraformRevolution®-Keramik

Die CeraformRevolution®-Keramiken wurden, wie die TriHA+-Würfel, statisch mit 500 000 Zellen (Osteosarkoma-Zellen) pro 20 Materialstücke besiedelt. Die besiedelten Trägermaterialien wurden auf ihre Zellkompatibilität und die Zellverteilung im Material untersucht. Auch hier wurde eine Proliferationskinetik erstellt. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte die Anfärbung mit einer DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid) bzw. mit Kristallviolettlösung. Abbildung 75 zeigt eine Übersicht fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten. Hier kam es im Gegensatz zu den besiedelten TriHA+-Würfeln nur zu einem leichten Anstieg an Zellkernen über den

Inkubationszeitraum und damit zu einer schwachen Proliferation der Zellen (vgl. Abbildung 67).

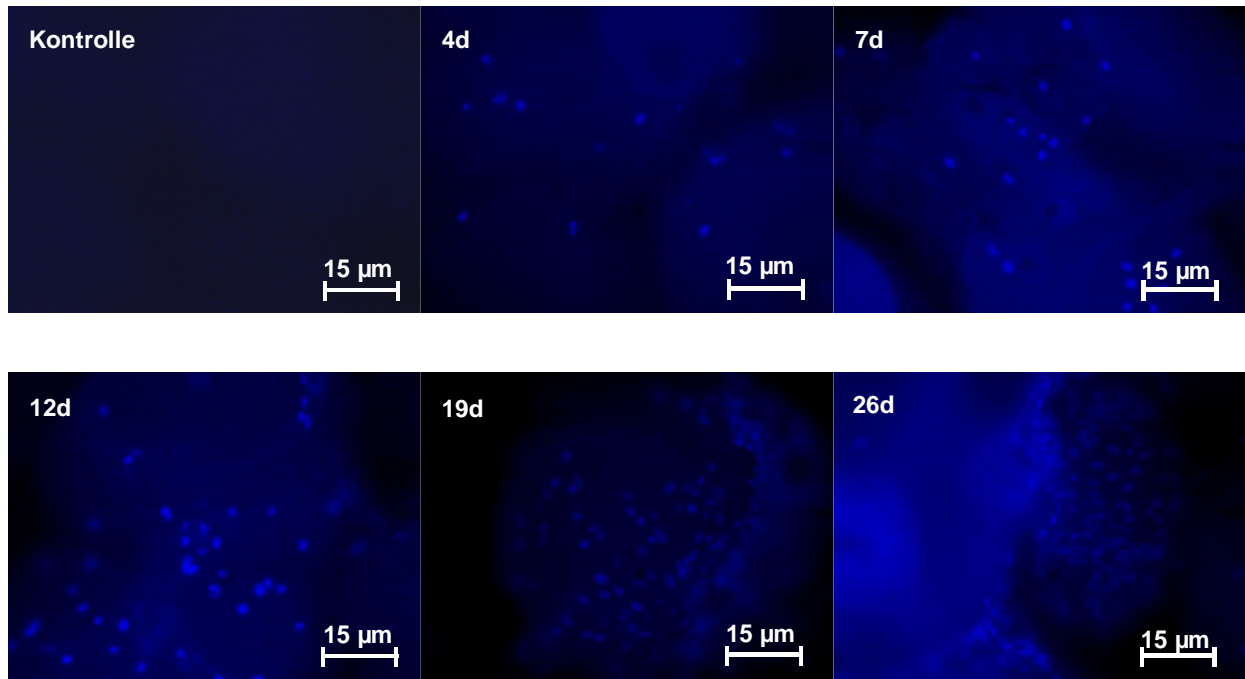


Abbildung 75: Übersicht der DAPI gefärbten, besiedelten Ceraform Revolution®-Keramiken zu verschiedenen Zeitpunkten bei 100-facher Vergrößerung.

Wie man Abbildung 76 entnehmen kann, zeigen die Aufnahmen der Kristallviolett gefärbten CeraformRevolution®-Keramiken keine wesentliche Zunahme der Zellzahl über die Inkubationszeit. Desweiteren war die Morphologie der Zellen im Gegensatz zu den Zellen auf den TriHA+-Würfeln deutlich verändert (vgl. Abbildung 68). Die Zellkörper waren deutlich verkleinert und auch die Ausbildung von Zellfortsätzen konnte nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 76).

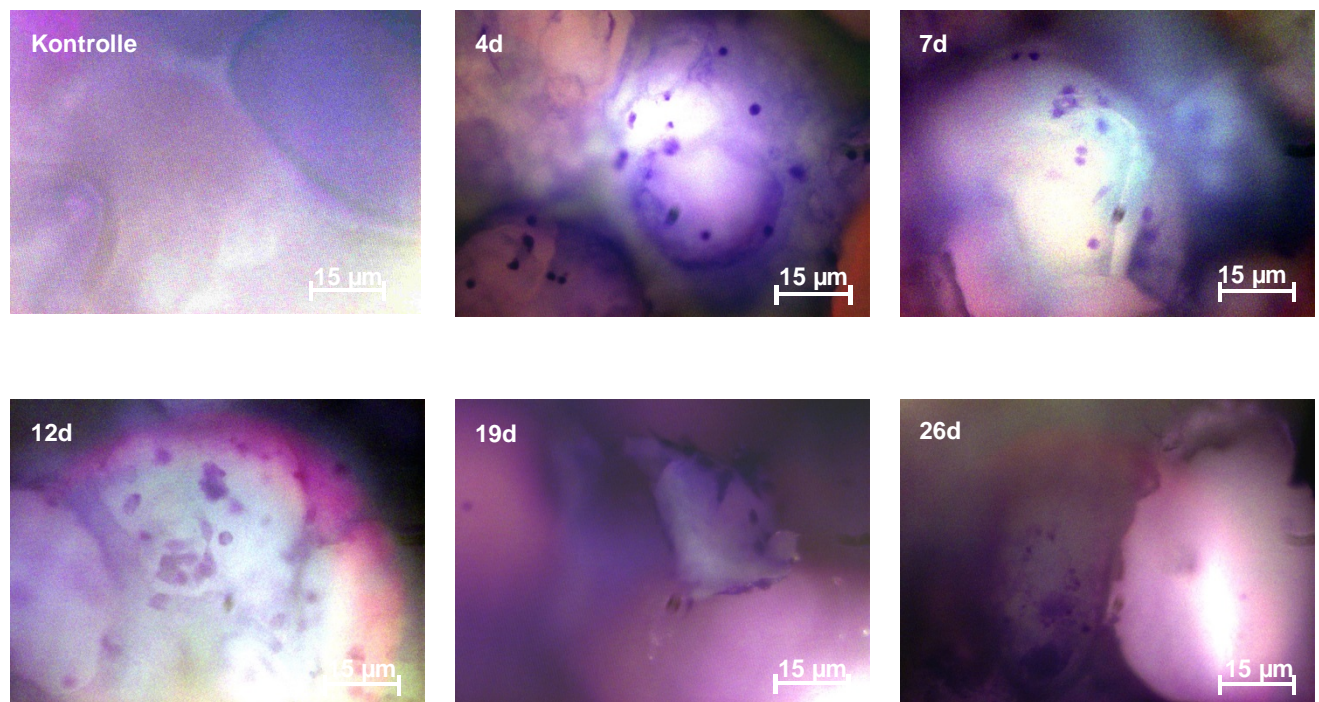


Abbildung 76: Übersicht der Kristallviolett gefärbten, besiedelten Ceraform Revolution®-Keramiken zu verschiedenen Zeitpunkten bei 100-facher Vergrößerung.

Auch das Ergebnis der Proliferationskinetik zeigte keine deutliche Zunahme der Extinktion über den Inkubationszeitraum und damit kaum proliferative Aktivität der Zellen. Nach 26 Tagen war der höchste gemessene OD-Wert von ca. 0,6 erreicht. Im direkten Vergleich zum TriHA+-Material -dieser OD-Wert wurde bei den TriHA+-Würfeln bereits nach 7 Tagen erreicht (vgl. Abbildung 69).

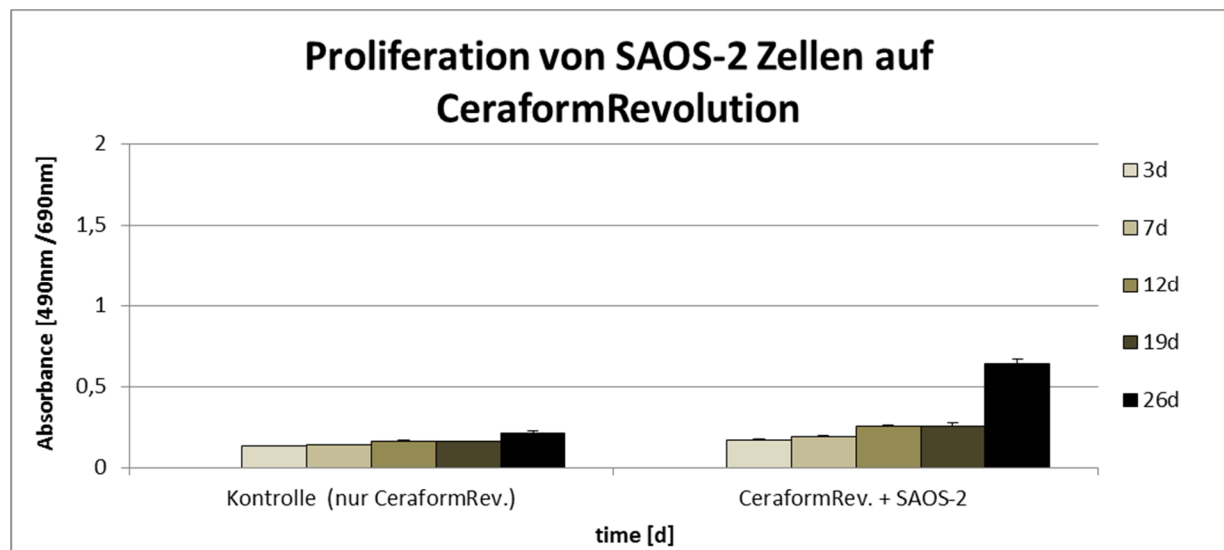


Abbildung 77: Prolifertionskinetik der SAOS-2 Zellen auf den CeraformRevolution®-Keramiken. Links: Übersicht der Extinktionswerte der unbesiedelten CeraformRevolution®-Keramiken (n=3). Rechts: Extinktionswerte der besiedelten Materialstücke zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten (n=6).

Für die in Abbildung 78 dargestellten Mittelwerte wurden für die Kontrollen (ohne Zellen) jeweils drei Materialstücke getestet, für die besiedelten Keramiken 6 Materialstücke.

Von den CeraformRevolution®-Keramiken wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbesiedelten und besiedelten Keramiken angefertigt (siehe Abbildung 78). Bild A zeigt eine unbesiedelte Keramik. Das Material ist insgesamt weniger offenporig wie die TriHA+-Keramik. Bild B zeigt eine besiedelte CeraformRevolution®-Keramik, obwohl die gleiche Ausgangszellzahl und Inkubationszeitpunkt gewählt wurde wie beim TriHA+-Würfel konnte man keine Zellen erkennen. Dies kann an der geringeren Proliferation der Zellen auf dem Material liegen oder an den verkleinerten Zellkörpern (vgl. Kristallviolett färbung Abbildung 76). Als weitere Möglichkeit könnte auch die etwas andere Materialzusammensetzung eine Rolle spielen, die evtl. als ähnlicher Farbton im REM

gezeigt wird wie die Zellen (Anmerkung: die Zellen sind bei allen REM-Aufnahmen ungefärbt).

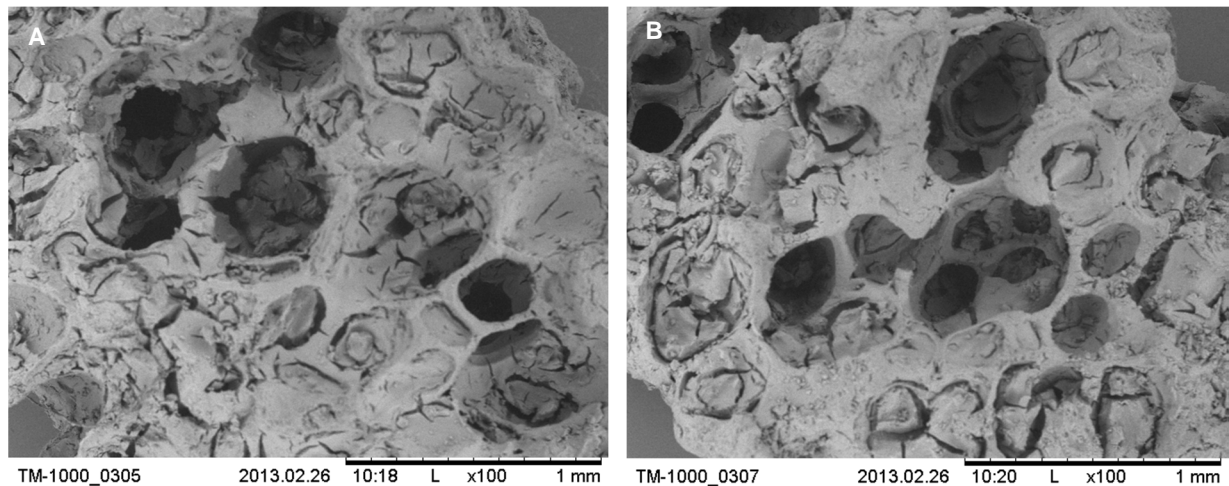


Abbildung 78: REM-Aufnahmen Ceraform Revolution®. Linkes Bild: unbesiedeltes Ceraform-Material (100-fache Vergrößerung). Rechtes Bild: Besiedeltes Ceraform-Material (100-fache Vergrößerung).

Da optisch keine Unterscheidung von unbesiedeltem zu besiedeltem Material erfolgen konnte wurde hier von einem mechanischen Zerstören des Material zur Untersuchung der Zellverteilung abgesehen.

1.37.6 PU-Schaum I

Zunächst wurde die Verteilung des bovinen Kollagen I innerhalb des PU-Schaums untersucht. Um die Verteilung des bovinen Kollagen I zu visualisieren wurde eine Doppelfärbung nach Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt (Färbung: Mouse-Anti-Collagen-1- monoklonaler Antikörper (ungefärbt) und sekundärer Anti-Maus-IgG (Alexa Fluor 488 markiert: fluoresziert im grünen Bereich). Die Fluoreszenz-Bilder wurden mit Durchlichtaufnahmen des Materials überlagert.

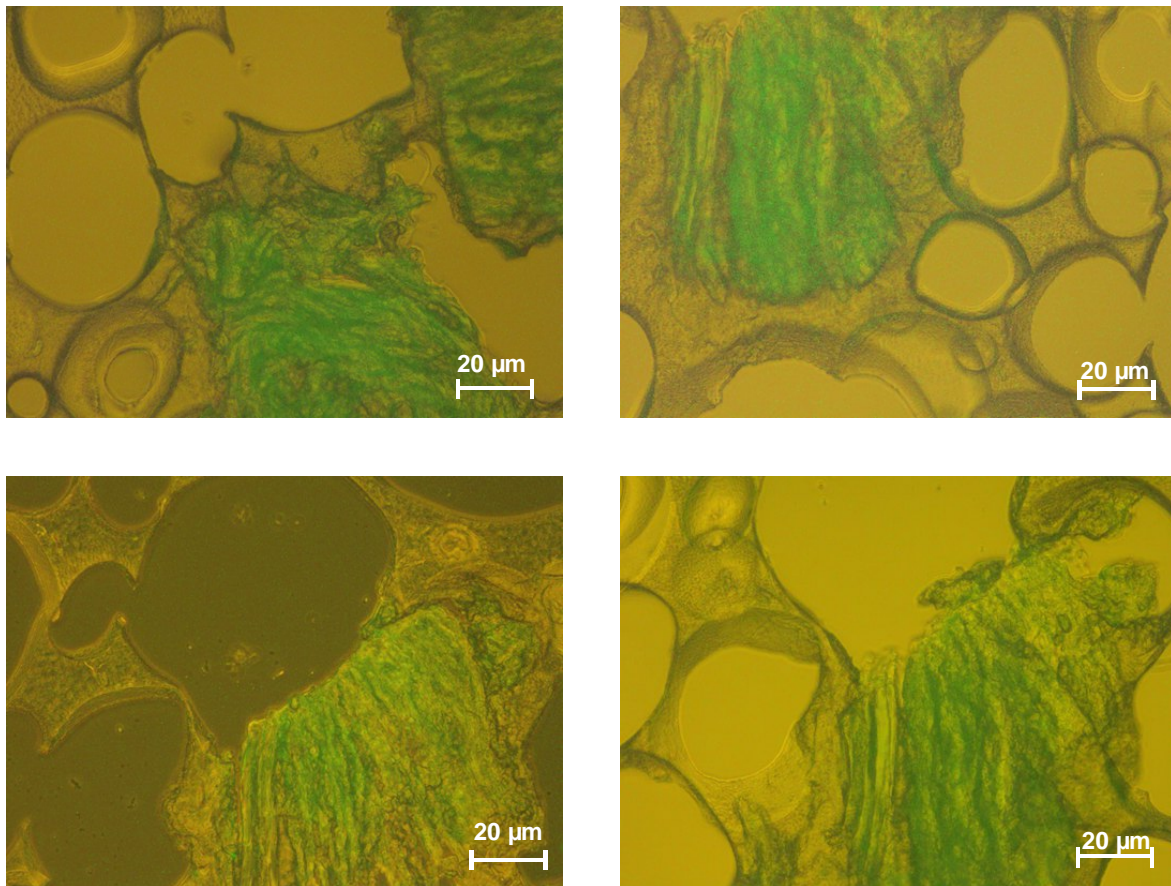


Abbildung 79: Überlagerungsaufnahmen (grüne Fluoreszenz/Durchlicht) des PU-Schaums bei 100 facher Vergrößerung.

Nach Anfärbung des bovinen Kollagens (ein Bestandteil des PU-Schaums) konnte man bündelartig zusammengelagerte Strukturen (=Kollagenaggregate) erkennen, die relativ homogen im gesamten Material verteilt waren (z.T. waren aber auch kleinere Bereiche vorhanden, die praktisch kollagenfrei waren). Auch anhand von Durchlichtaufnahmen von PU-Schaum- Dünnschnitten (25-fache Vergrößerung) konnte man die Kollagenaggregate gut im Material erkennen (siehe Abbildung 80).

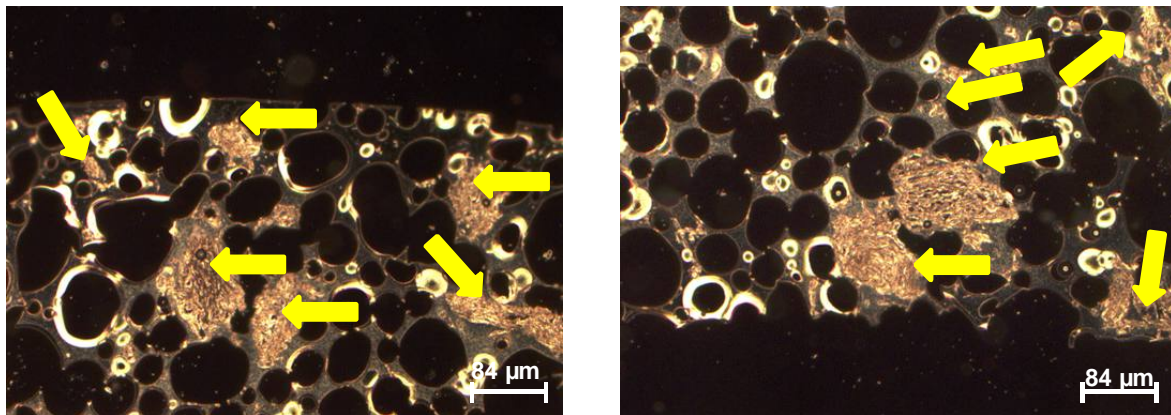


Abbildung 80: Durchlichtaufnahmen des PU-Schaums bei 25-facher Vergrößerung.

Innerhalb des transparenten PU-Schaums ließen sich die Kollagen-Aggregate gut als ocker-farbene Bündel erkennen (siehe gelbe Pfeile).

Nach der Charakterisierung des PU-Schaum Materials wurde die Proliferationskapazität und das osteogene Differenzierungspotential hMSC auf dem PU-Material getestet. Zunächst musste jedoch eine geeignete und effiziente Besiedelungsmethode (siehe Kapitel 1.16) gefunden werden. In Abbildung 83 sind die Ergebnisse des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay-Experiments graphisch dargestellt. Das Einbringen der Zellen in das Polyurethan-Material mittels einer Kanüle zeigte sich in etwa gleichwertig mit den Ergebnissen der konventionellen Besiedelungsmethode. Um ein gleichmäßiges Einbringen der MSC in das Polyurethan-Material zu gewährleisten wurde als weitere Strategie die Besiedelung der PU-Scaffolds mittels Vakuumbbeutel getestet (wie in 1.16.2 beschrieben). 3 PU-Schäume in Vakuumbbeuteln wurden zeitgleich mit derselben Anzahl an MSC besiedelt und nach 1-stündiger Adhäsionsphase in frisches Kulturmedium überführt.

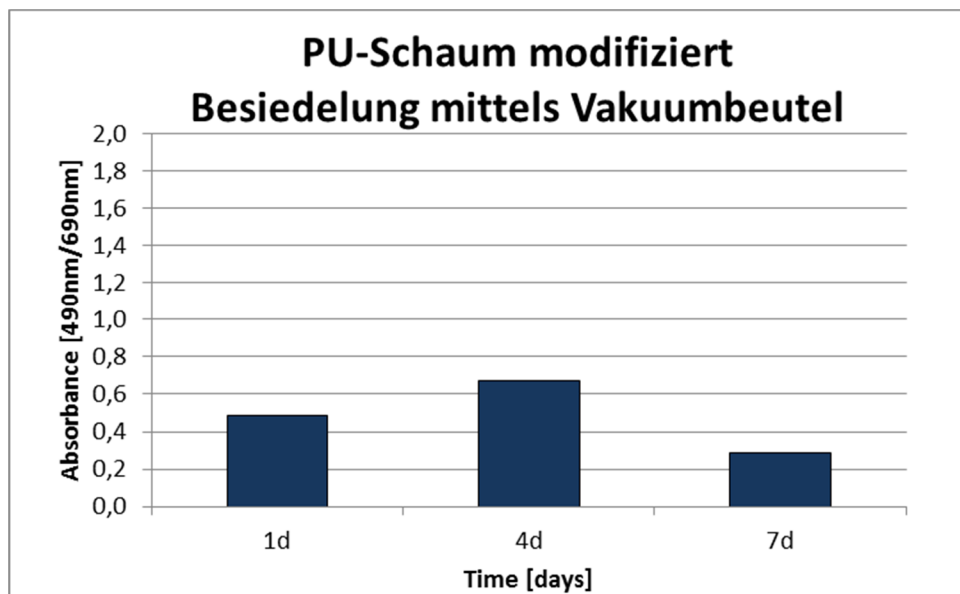


Abbildung 81: Proliferationskinetik hMSC (Spender 162). Die Zellbesiedelung des PU-Schaums erfolgte mittels Vakuumbbeutel (n=1).

Wie man Abbildung 81 entnehmen kann, zeigen die graphisch dargestellten Ergebnisse des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assays, dass die Zellzahl über den Inkubationszeitraum sogar abnimmt. Hier wurde aufgrund der begrenzten Stückzahl der zur Verfügung gestellten Vakuumbbeutel lediglich 3 PU-Schäume besiedelt. Deren Extinktionswerte wurden nach 1, 4 und 7 Tagen ermittelt. Auffallend war hier, dass der absolute Vitalitätswert nur sehr gering war im Vergleich zu den konventionell besiedelten PU-Schäumen (vgl. Abbildung 89). Der gemessene Vitalitätswert fiel im Verlauf der Inkubation sogar ab. Direkt nach der Vakuumbesiedelung der PU-Stücke wurde ein Teil der Besiedelungsflüssigkeit, die im Vakuumbbeutel zurückgeblieben ist, ausplattiert und nach 24 Std. die Morphologie der Zellen in Abbildung 82 dokumentiert.

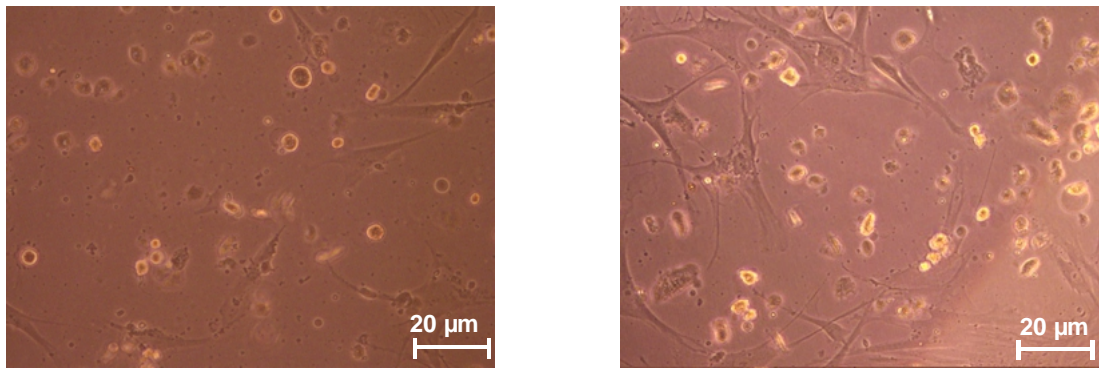


Abbildung 82: Ansicht der Zellen nach der Vakuumbesiedelung bei 100-facher Vergrößerung.

Man kann deutlich erkennen, dass ein Großteil der Zellen abgelöst im Medium schwamm, während nur ein kleiner Teil der Zellen die Prozedur der Vakuumbesiedelung überlebt hatte (mit den folgenden Schritten: Ablösung der Zellen mittels Trypsinbehandlung, Zentrifugation, Resuspendieren, Aufnehmen mittels Kanüle, Einspritzen in das Septum, Vakuum).

Bei beiden Besiedelungsvarianten wurden Zellen desselben Spenders (Nr. 162) verwendet und auch die Gesamtzellzahl pro PU-Schaum wurde mit 2 Mio Zellen bei beiden Varianten konstant gehalten. Da die Zellen bei der konventionellen Methode gleichmäßiger über das Material verteilt waren wie in den anderen beiden getesteten Methoden- und diese Methode zudem schonender für die Zellen war -wurde in den weiteren Experimenten und im Tierversuch stets die konventionelle Besiedelungsstrategie angewandt.

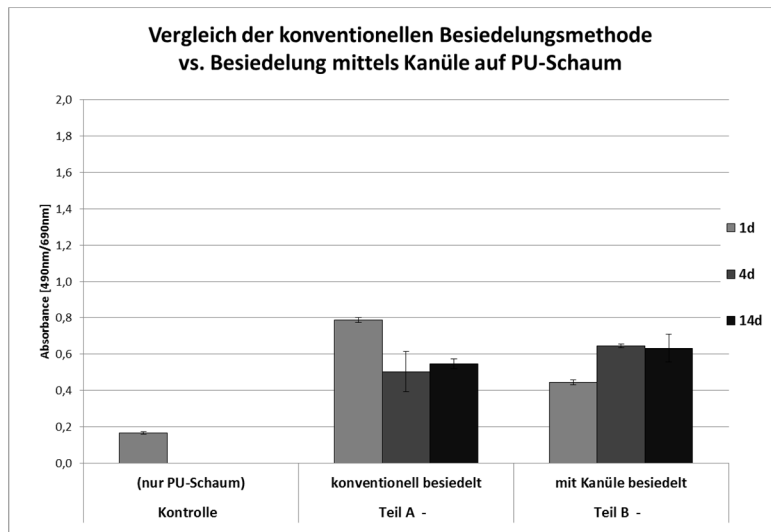


Abbildung 83: Vergleich Besiedelungsmethoden auf PU-Schaum (n=6). Zellen hMSC, Spender 162, 500.000 Zellen pro Materialstück.

Um eine bessere Proliferation der hMSC auf dem Polyurethanmaterial zu erzielen, wurde eine Vorinkubation des Materials mit einer physiologischen Albuminkonzentration durchgeführt. Wie die graphisch dargestellten Proliferationsergebnisse aus Abbildung 84 zeigen, führte die Albuminvorbehandlung des Polyurethanmaterials zu keinerlei Verbesserung der Zellproliferation.

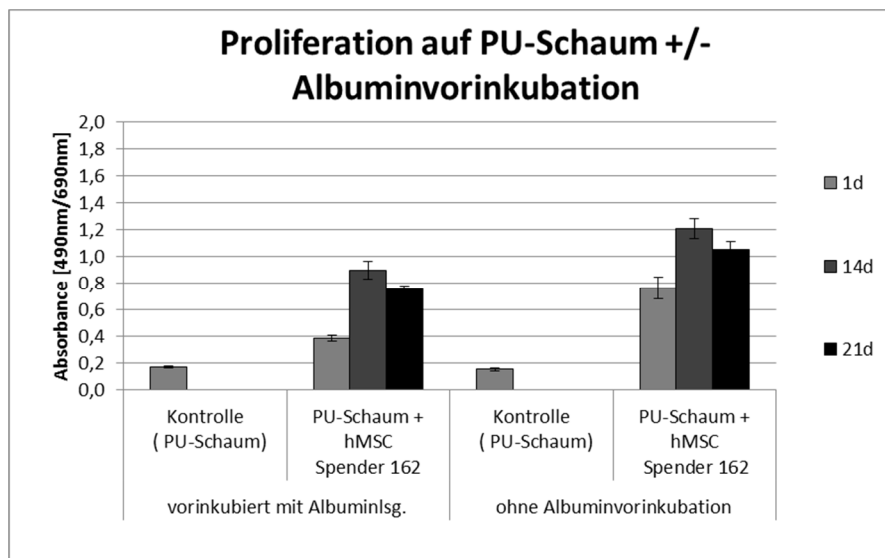


Abbildung 84: Proliferation auf nicht-modifiziertem PU-Schaum mit und ohne Albuminvorinkubation (n=6), Zellen hMSC Spender 162, 200 000 Zellen pro Material.

Die gemessenen Extinktionswerte waren im Vgl. zu den anderen getesteten Knochenersatzmaterialien (wie etwa TriHA+-Würfel) gering. Um dieses Material im Tierversuch einsetzen zu können wurden Toxizitätsuntersuchungen vom Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI Reutlingen) durchgeführt. Bei der Herstellung des Materials wurde nach sämtlichen verfahrenstechnischen Schritten Proben entnommen und auf ihre Toxizität überprüft. Es wurde auch geprüft ob zusätzliche Waschschrirte zu einer Reduktion der Toxizität führt. Im Verlauf der Untersuchung des Materials stellte sich heraus, dass die Änderung der Sterilisationsmethode (ETO-Sterilisation statt Gammasterilisation) ebenfalls zu einer starken Verbesserung der Toxizität führte. Dieser verbesserte, weniger toxische PU-Schaum (PU-Schaum II) wurde in den weiteren *in vitro*- Experimenten und im Tierversuch eingesetzt.

1.37.7 PU-Schaum II: Modifizierter PU-Schaum

Nach der Modifizierung des Polyurethanschaums wurde überprüft, ob eine bessere Verteilung der Zellen durch die Vakuumbesiedelungsmethode (wie unter 1.16.2 beschrieben) im Gegensatz zur konventionellen Besiedelungsmethode (siehe 1.16.1) erzielt werden kann. Hierfür wurden die Variablen Zellzahl, Stammzellspender, Zellpassage, Kulturmedium und Kultivierungsbedingungen für beide Besiedelungsvarianten konstant gehalten.

Abbildung 85 zeigt Fluoreszenzaufnahmen (DAPI) von PU-Dünnschnitten, die im Innenbereich von vakuumbesiedeltem Material aufgenommen wurden. Hier konnten nur sehr wenige Zellkerne und damit Zellen detektiert werden.

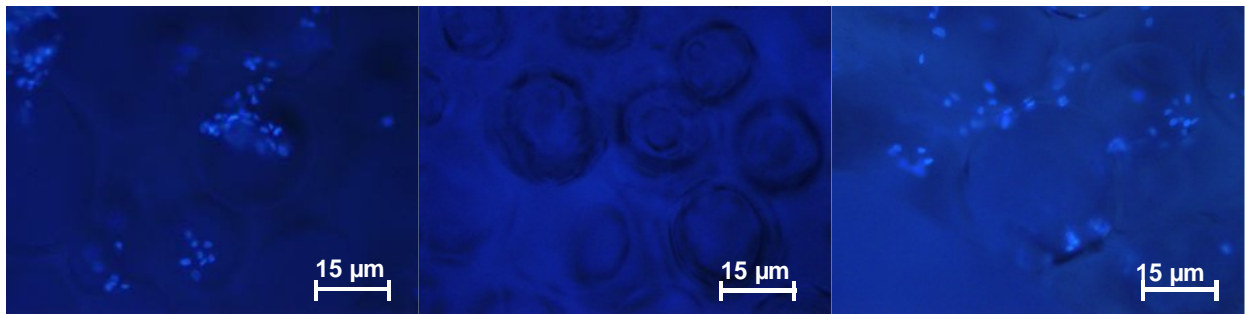


Abbildung 85: DAPI-Aufnahmen an PU-Schnitten im Innenbereich des Schaums nach Vakuumbesiedelung (x100).

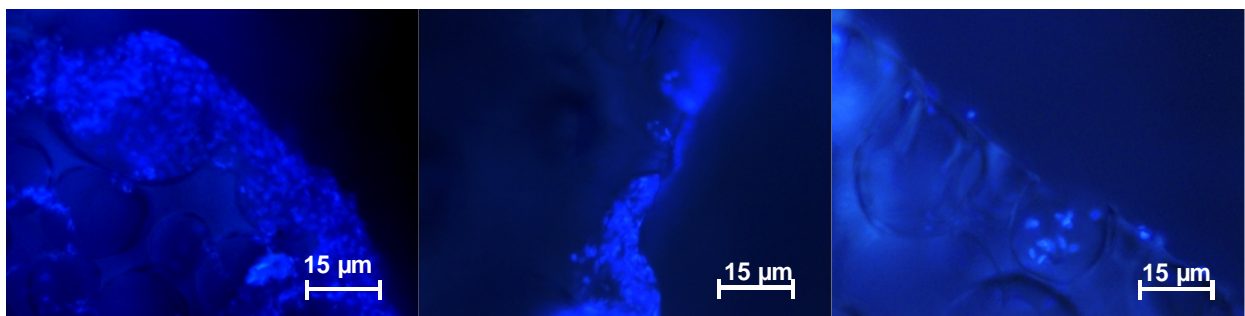


Abbildung 86: DAPI-Aufnahmen an PU-Schnitten im Außenbereich nach Vakuumbesiedelung (x100).

In Abbildung 86 dagegen werden Fluoreszenzaufnahmen von PU-Dünnschnitten des äußeren Materialbereichs (Ränder) gezeigt, diese zeigen eine dicke Zell-Layer (mehrere Lagen) an den Außenbereichen des Materials.

Werden die visuellen Ergebnisse der Vakuumbesiedelung, mit denen der konventionellen Methode gegenübergestellt, so lässt sich kein deutlicher Unterschied feststellen. Auch bei der konventionellen Besiedlungsmethode sind im Materialinneren nur sehr wenige Zellen erkennbar (Abbildung 87).

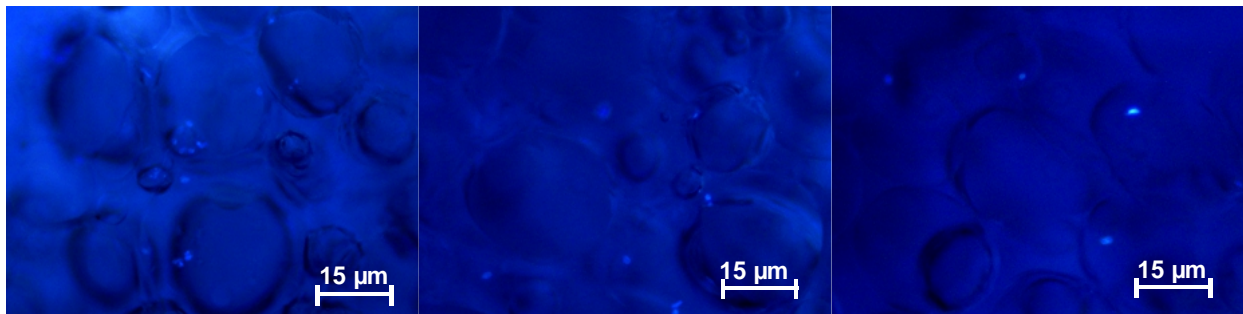


Abbildung 87: DAPI-Aufnahmen an PU-Schnitten im Innenbereich des Schaums nach konventioneller Besiedelung (x100).

Dagegen befinden sich bei der konventionellen Methode an den Außenbereichen der PU-Dünnschnitte ebenfalls mehrlagige Zellschichten (siehe Abbildung 88)

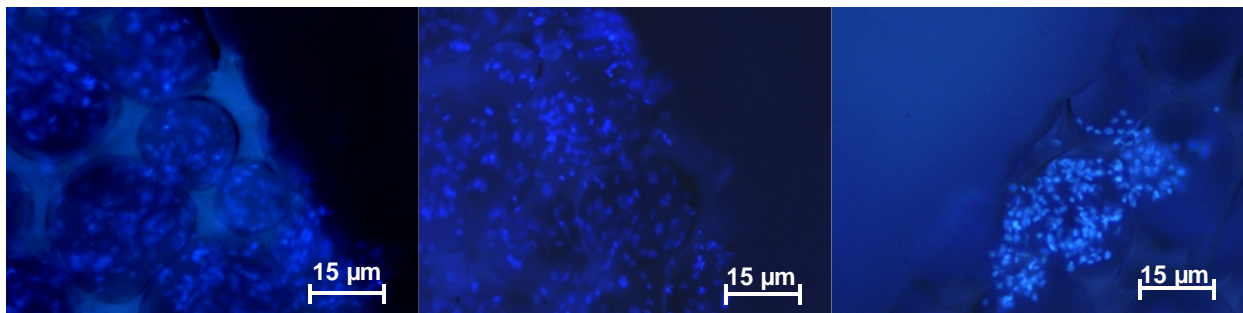


Abbildung 88: DAPI-Aufnahmen an PU-Schnitten im Außenbereich nach konventioneller Besiedelung (x100).

Für den tierexperimentellen Versuch wurde die konventionelle Besiedelungsmethode gewählt, da beide Besiedelungsmethoden zu einer gleichen (aber nicht gleichmäßigen) Zellverteilung führten. Die konventionelle Besiedelungsvariante war dennoch überlegen, da bei der Vakuummethode die Parameter Zellvitalität (vgl. Abbildung 81) und Zellmorphologie (vgl. Abbildung 82) deutlich schlechter abgeschnitten haben im Vergleich mit den konventionell besiedelten Proben. Diese zeigten neben einer normalen Zellmorphologie auch ein starkes Wachstum auf dem modifizierten Polyurethan-Material (siehe Abbildung 89).

Im Gegensatz zum nicht-modifizierten PU-Schaum ist die Proliferation auf dem modifizierten PU-Schaum sehr gut (vgl. Abbildung 83). Beim modifizierten PU-Schaum wurden OD-Werte von bis zu 1,65 gemessen (obwohl hier nur 350 000 Zellen eingesetzt wurden) während beim nicht-modifizierten PU-Schaum nur Maximalwerte von OD=0,8 gemessen wurden (obwohl für diesen Versuch 500 000 Zellen eingesetzt wurden).

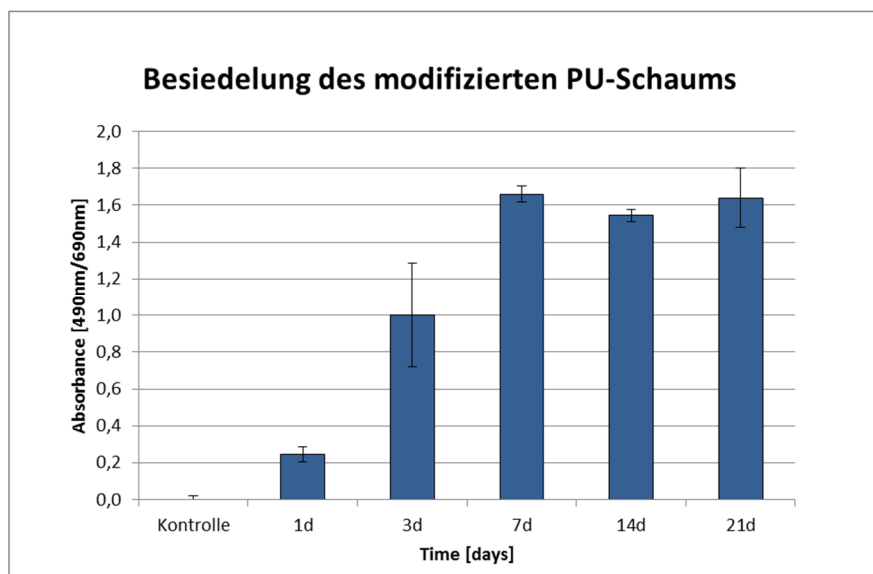


Abbildung 89: Proliferationskinetik hMSC (Spender 162, 350 000 Zellen/Materialstück) auf PU-Schaum (n=6).

Nach der Messung der Farbstoffumsetzung für den Promega-Assay wurden die Probenstücke fixiert und DAPI/ Durchlichtaufnahmen erstellt. Abbildung 90 zeigt exemplarisch die Aufnahmen des 21 Tage Werts. Hier zeigte sich, dass die Zellen vor allem in den Außenbereichen zu finden waren, im Inneren des Materials konnten kaum Zellkerne detektiert werden. Die Poren des Materials hatten für die Einheilung von Zellen eine ausreichende Größe, jedoch scheint das Porensystem des PU-Schaums nicht durchgängig offen zu sein.

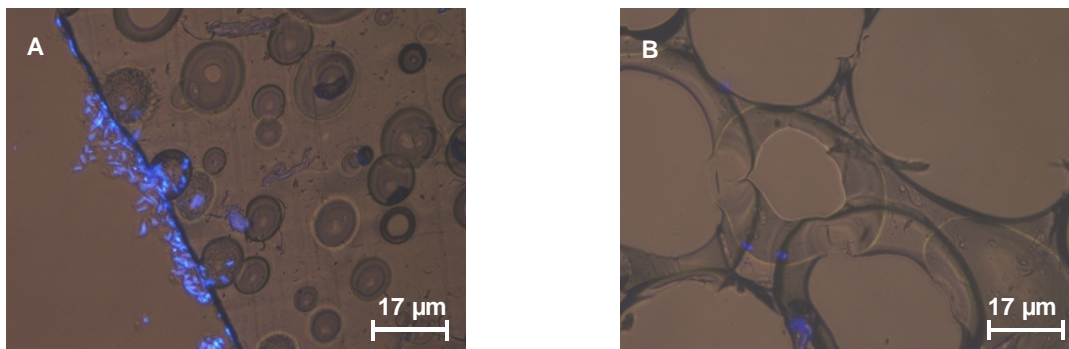


Abbildung 90: Überlagerungen der DAPI/Durchlichtaufnahmen (100-fache) Vergrößerung der Probenstücke nach 21 Tagen Inkubationszeit. A: Außenbereich B: Innenbereich.

Abbildung 91 zeigt REM- Aufnahmen des Polyurethanschaum bei 100- facher Vergrößerung. Neben dem porösen Polyurethanmaterial ist auch die Kollagenmembran (Bild A und B) deutlich erkennbar (K).

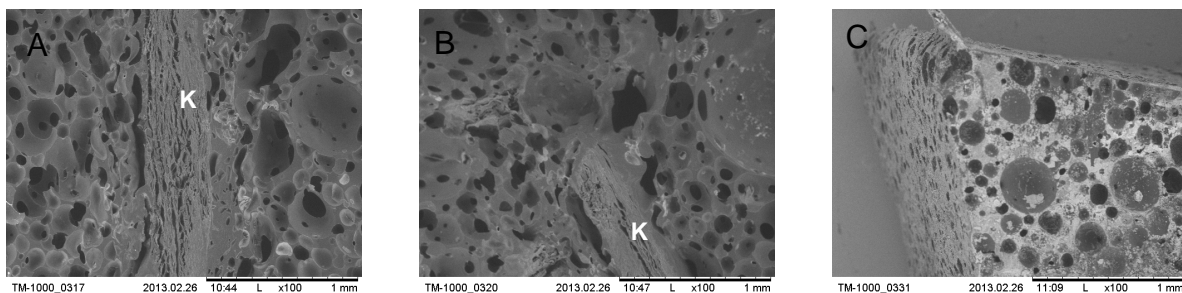


Abbildung 91: REM-Aufnahme bei 100-facher Vergrößerung. A: eines unbesiedelten PU-Schaums; B: eines besiedelten PU-Schaums und C: eines besiedelten PU-Schaums, die Zellen wurden für $t = 17$ d osteogen induziert.

Nach 17 Tagen osteogener Differenzierungszeit trat eine sehr starke Mineralisierung ein (Abbildung 91 Bild C). Auf dem gesamten PU-Schaum waren kleine, weiße mineralische Partikel erkennbar v.a. an den Rändern des Materials (siehe auch Abbildung 92). Die Zellen selbst waren auf den REM-Aufnahmen leider nicht zu erkennen (siehe Abbildung 91 Bild B), wahrscheinlich bilden sie keinen ausreichenden Kontrast in den REM-Aufnahmen aufgrund der ähnlichen Dichte wie das Polyurethanmaterial.

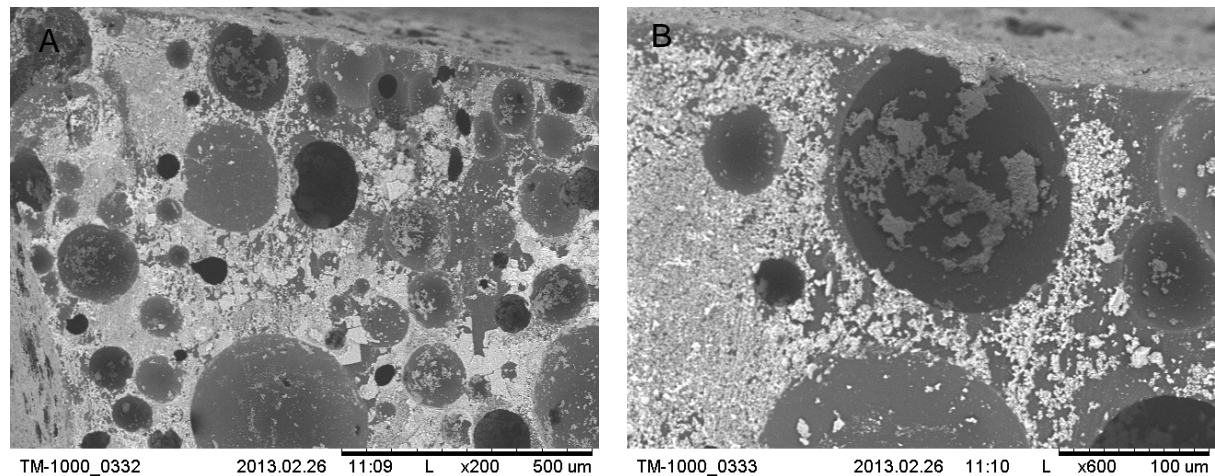


Abbildung 92: REM-Aufnahmen des PU-Materials mit Zellen, die für $t=17$ d osteogen differenziert wurden. A: 200-fache Vergrößerung; B: 600-fache Vergrößerung.

Besiedelung des modifizierten PU-Schaums mit ovinen MSC

Das Polyurethan-Material sollte im Verlauf des Experiments mit ovinen MSC besiedelt werden um später im Versuchstier Schaf getestet werden zu können. Dementsprechend fanden Vorversuche mit ovinen Stammzellen statt um auch im Modelltier Schaf die Verteilung und Differenzierbarkeit auf dem Polyurethan-Material zu untersuchen. Zunächst wurden verschiedene Stücke aus Polyurethan-Schaum mit ovinen Stammzellen besiedelt und nach 0 bzw. 10 Tagen ein Zellvitalitätstest gemacht (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Fa. Promega). Es fand, genauso wie im humanen System, eine Proliferation der Stammzellen auf dem Material statt (Daten nicht gezeigt). Um die Verteilung der Zellen im Material zu beurteilen wurden die Zellen mit ovinen MSC besiedelt, inkubiert und dann Dünnschnitte des Material angefertigt (mittels Kryotom). Diese Dünnschnitte wurden dann mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid) angefärbt. In Abbildung

92 werden zwei Aufnahmen aus dem Außenbereich des PU-Schaums (Bild A) bzw. dem Materialinneren (Bild B) dargestellt (Überlagerung der DAPI-Aufnahmen mit Durchlichtaufnahmen, 100-fache Vergrößerung).

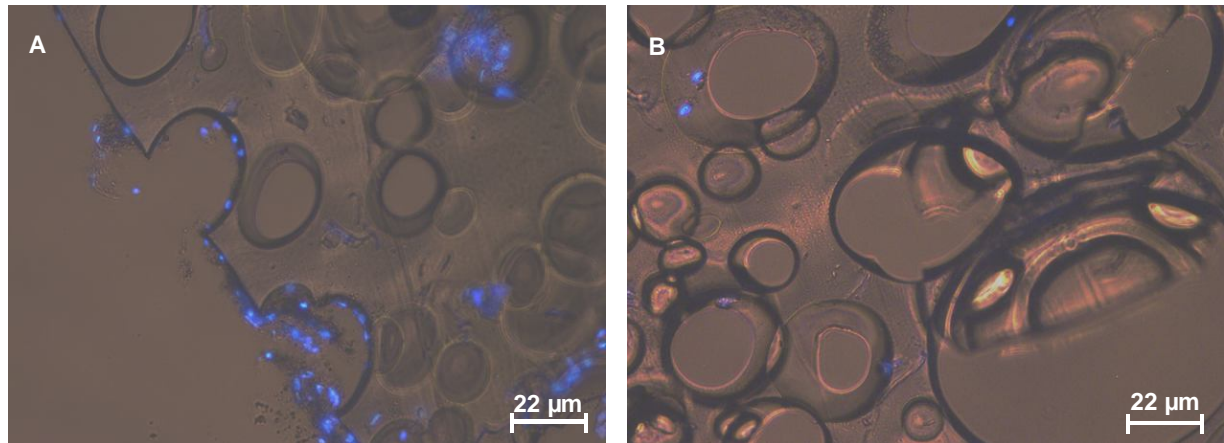


Abbildung 93: Überlagerungen der DAPI/Durchlichtaufnahmen (100-fache) Vergrößerung der Probenstücke besiedelt mit ovinen MSC nach 15 Tagen Inkubationszeit. A: Außenbereich B: Innenbereich.

Nach einer Wachstumsdauer von 10 Tagen wurde ein Teil der ovinen Zellen osteogen induziert (siehe Abbildung 95 und Abbildung 96), ein Teil wurde als Kontrolle in Kulturmedium ohne osteogen wirkende Additive weiterkultiviert (siehe Abbildung 94). Die unstimulierte Negativkontrolle zeigt nach dem Anfärben mit Alizarinrot keine kalziumhaltige Matrix.

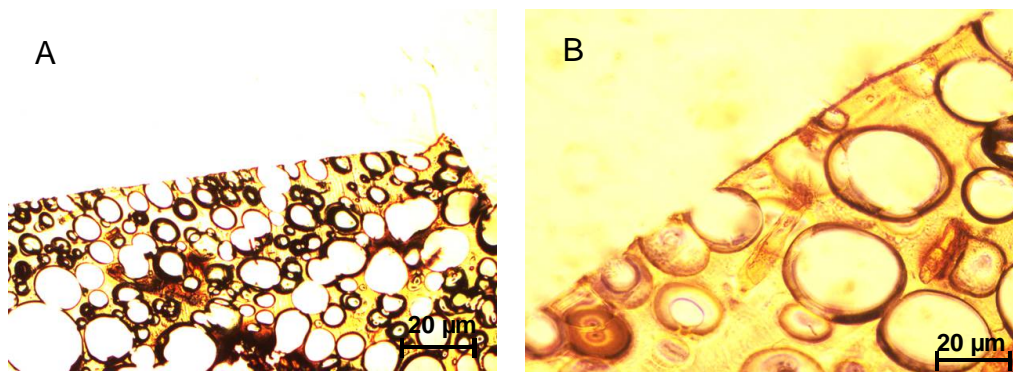


Abbildung 94: Dünnschnitt PU-Schaum besiedelt mit ovinen MSC, die Zellen wurden nicht osteogen differenziert (Kontrolle). Alizarinrotfärbung: Anfärben der osteogenen Matrix für Kalziumnachweis. A: 25-fache Vergrößerung und B: 100-fache Vergrößerung.

Die Zellen waren sehr schlecht auf dem Polyurethan-Material erkennbar. Nur in der 100-fachen Vergrößerung (Abbildung 94 Bild B) lassen sich die Zellen als „braun-farbene Ablagerung“ in den Vertiefungen der Poren erkennen. Die Zellen befanden sich fast ausschließlich im Außenbereich des Materials (in Übereinstimmung mit den angefertigten DAPI-Aufnahmen siehe Abbildung 93). Dies wurde vor allem in den osteogen differenzierten Proben deutlich (siehe Abbildung 95 und Abbildung 96). Da sich die Zellen nur im Außenbereich befanden, wurde auch nur im äußeren Bereich eine mineralische Matrix synthetisiert welche durch das Anfärben mit Alizarinrot deutlich sichtbar gemacht wurde.

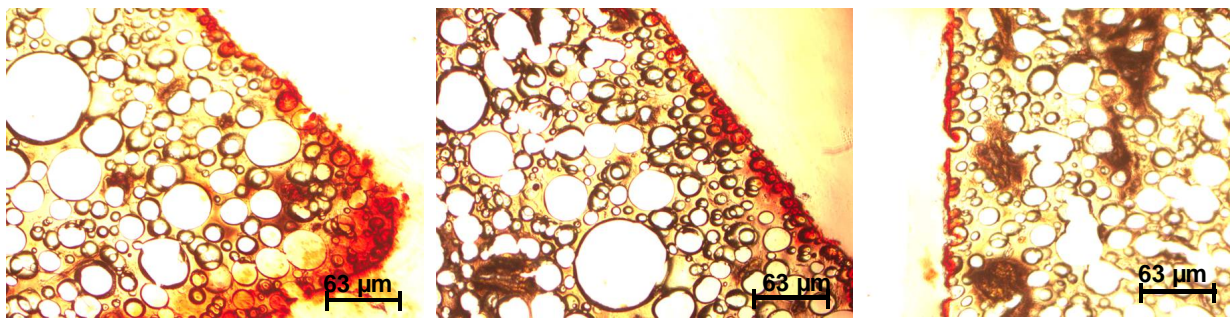


Abbildung 95: Dünnschnitt PU-Schaum besiedelt mit ovinen MSC, 15 Tage osteogen differenziert. Alizarinrotfärbung: Anfärben der osteogenen Matrix für Kalziumnachweis (25-fache Vergrößerung).

Im Inneren des Polyurethan-Materials befanden sich kaum/ keine Zellen dementsprechend waren die Bereiche im Material auch nicht bzw. nur wenig angefärbt.

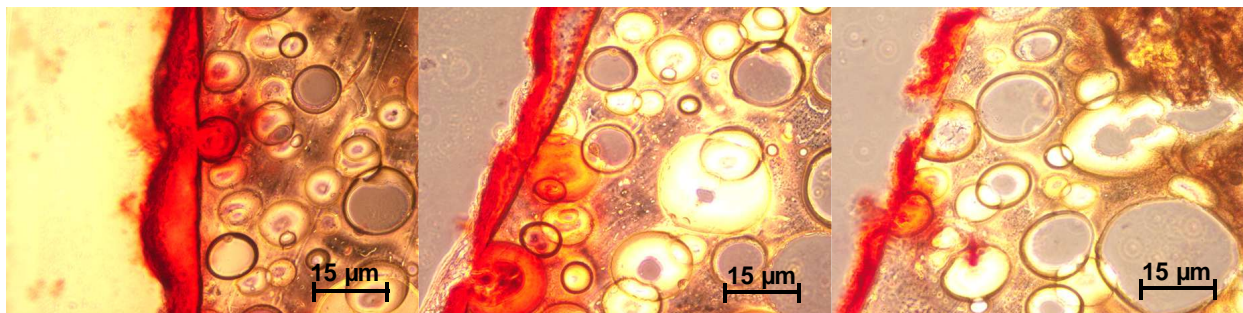


Abbildung 96. Dünnschnitt PU-Schaum besiedelt mit ovinen MSC, 15 Tage osteogen differenziert. Alizarinrotfärbung: Anfärben der osteogenen Matrix für Kalziumnachweis (100-fache Vergrößerung).

1.37.8 Actifit®

Das Actifit®-Material, ein synthetisches, biologisch abbaubares Polyurethanmaterial wurde zunächst mit ovinen MSC besiedelt ($4,5 \times 10^5$ Zellen) und kultiviert. Ein Teil des Materials wurde nach einer Adhärenzphase von 24 Stunden in ein osteogenes Medium überführt (für $t = 14$ Tage). Nach dem Fixieren der Materialstücke wurden REM-Aufnahmen angefertigt (siehe Abbildung 97 bis Abbildung 99).

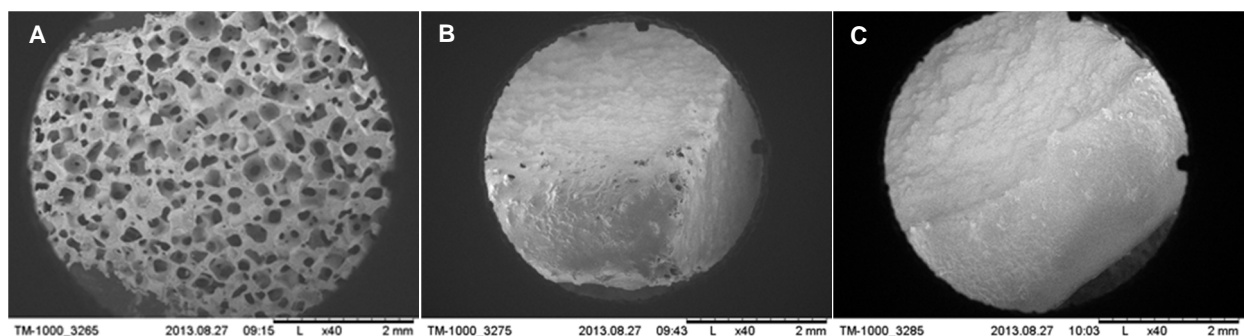


Abbildung 97: REM-Aufnahmen Actifit®-Material (40-fache Vergrößerung). A: unbesiedeltes Material; B: besiedeltes Material mit oMSCs Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück; C: Besiedeltes Material ovine MSC Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück, die Zellen wurden 14 d osteogen differenziert.

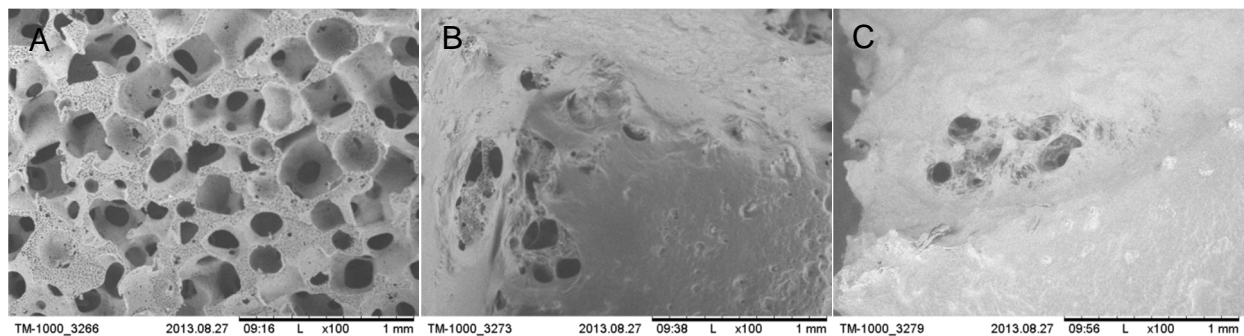


Abbildung 98: REM-Aufnahmen Actifit®-Material (100-fache Vergrößerung). A: unbesiedeltes Material; B: besiedeltes Material mit oMSCs Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück; C: Besiedeltes Material ovine MSC Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück, die Zellen wurden 14 Tage osteogen differenziert.

Wie vom Hersteller beschrieben, konnte man beim zellfreien Actifit®-Material eine stark vernetzte Porenstruktur erkennen (Abbildung 97 bis Abbildung 99 jeweils

Bild A). Wurden die Actifit®-Träger mit Zellen besiedelt verschwand die poröse Struktur vollständig (siehe Abbildung 97 bis Abbildung 99 jeweils Bild B). Die Zellen nahmen das Material sehr gut an und füllten auch kleine Poren vollständig aus. Die vom Hersteller (Orteq® Ltd.) aufgestellte These, dass das Material das Einwachsen von körpereigenem Gewebe bzw. Zellen fördert wurde durch die REM-Aufnahmen bestätigt. Das Polyurethan-Polymer wurde in klinischen Studien bereits mit positivem Ergebnis als Meniskusersatz getestet (Verdonk et al., 2012). Es könnte aber auch für den Einsatz als Knochenersatzmaterial interessant sein, da sowohl die Porengröße die Anforderungen eines „idealen Knochenersatzmaterials“ erfüllt als auch die Fähigkeit der hMSC auf diesem Material zu Knochenzellen zu differenzieren (siehe Abbildung 97 bis Abbildung 99 jeweils Bild C). Das von den osteogen induzierten Zellen gebildete Hydroxylapatit konnte als weiße Schicht deutlich von den zellbesiedelten, undifferenzierten Kontrollen ohne osteogene Induktion, welche in den REM-Bildern grau abgebildet wurden, unterschieden werden (vergleiche Abbildung 99 Bild B und C). In der 1200-fachen Vergrößerung zeigte sich am deutlichsten, dass es auf dem Material zu einem sehr guten osteogenen Differenzierungsprozess der Zellen kommt. Die Materialstruktur war aufgrund der dicken, synthetisierten mineralischen Hydroxylschicht nicht mehr sichtbar.

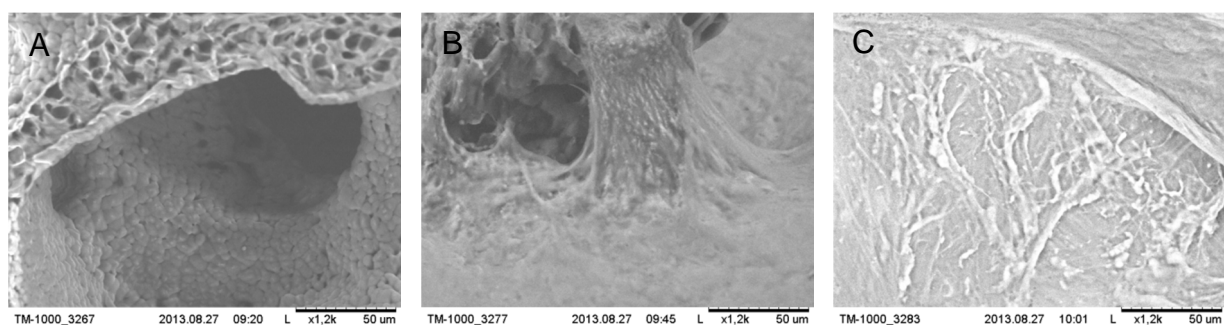


Abbildung 99: REM-Aufnahmen Actifit®-Material (1200-fache Vergrößerung). A: unbesiedeltes Material; B: besiedeltes Material mit oMSCs Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück; C: Besiedeltes Material ovine MSC Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück, die Zellen wurden 14 Tage osteogen differenziert.

1.37.9 Osteovit®

Nach Herstellerangaben besitzt dieses Knochenersatzmaterial eine gute Gewebekompatibilität, hohe Resorbierbarkeit und die poröse Kollagenstruktur fördert das Einsprossen von körpereigenem Gewebe. Durch die hohe Elastizität des schwammartigen Materials passen sich die Osteovit®-Würfel gut an den jeweiligen Knochendefekt an. Das Osteovit®-Material wurde als Referenzmaterial zum Polyurethanmaterial ebenfalls im Tierversuch getestet. Im Gegensatz zum neuentwickelten PU-Schaum ist das Osteovit®-Material jedoch bereits klinisch zugelassen. Zunächst wurde das Material auf Zellkompatibilität und Differenzierbarkeit der Zellen geprüft. Hierfür wurde das Osteovit®-Material mit ovinen Stammzellen besiedelt (450.000 Zellen/Stück) und nach einer Adhärenzphase von 24 Stunden in Standardkulturmedium weiterkultiviert (37 °C, 5% CO₂) bzw. in ein osteogenes Medium überführt (für t= 14 Tage).

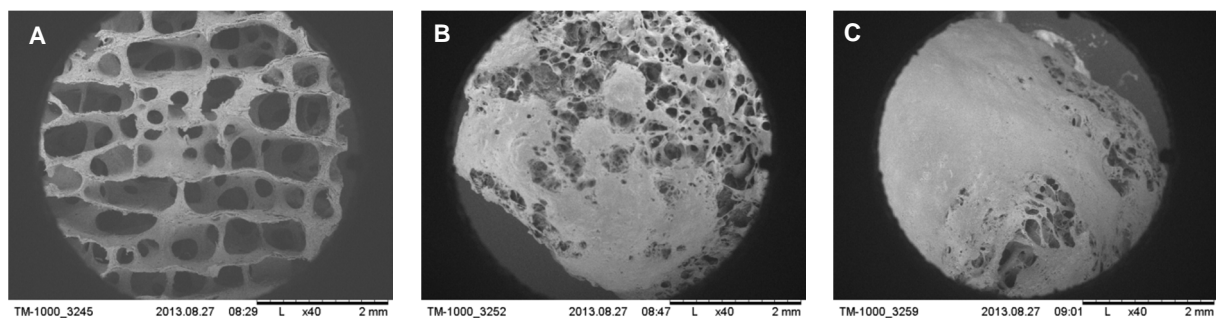


Abbildung 100: REM-Aufnahmen Osteovit®-Material (40-fache Vergrößerung). A: unbesiedeltes Material; B: besiedeltes Material mit oMSCs Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück; C: Besiedeltes Material ovine MSC Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück, die Zellen wurden 14 Tage osteogen differenziert.

Nach dem Fixieren der Materialstücke wurden REM-Aufnahmen angefertigt. Die poröse Kollagenstruktur des Materials war deutlich in den REM-Aufnahmen

(Abbildung 100 bis Abbildung 102 jeweils Bild A) erkennbar. Nach der Besiedelung des Osteovit®-Materials änderte sich die äußere Morphologie des Materials deutlich.

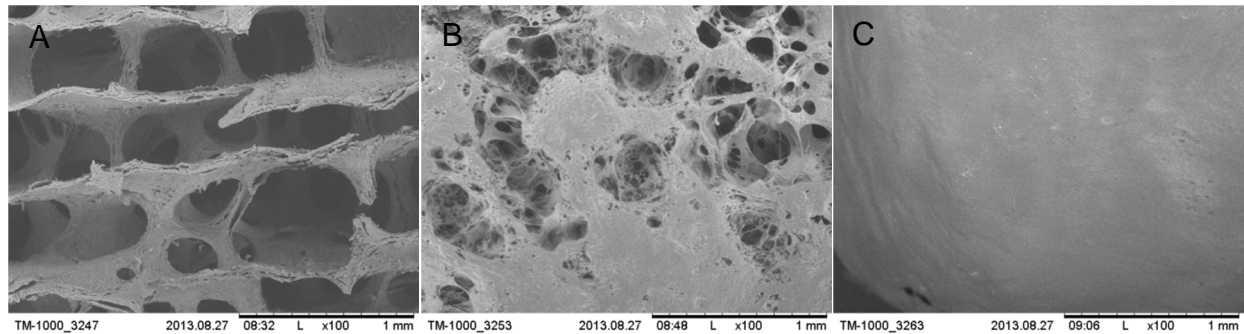


Abbildung 101: REM-Aufnahmen Osteovit®-Material (100-fache Vergrößerung). A: unbesiedeltes Material; B: besiedeltes Material mit oMSCs Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück; C: Besiedeltes Material ovine MSC Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück, die Zellen wurden 14 Tage osteogen differenziert.

Der strukturierte, regelmäßige Aufbau verschwand vollständig durch die Zugabe der Zellen. Die Porenstruktur war nur noch rudimentär vorhanden. In der Mehrzahl der Poren konnten zelluläre Strukturen beobachtet werden. Die langen Zellfortsätze waren vor allem in der 1200-fachen Vergrößerung gut sichtbar (siehe Abbildung 102 Bild B)

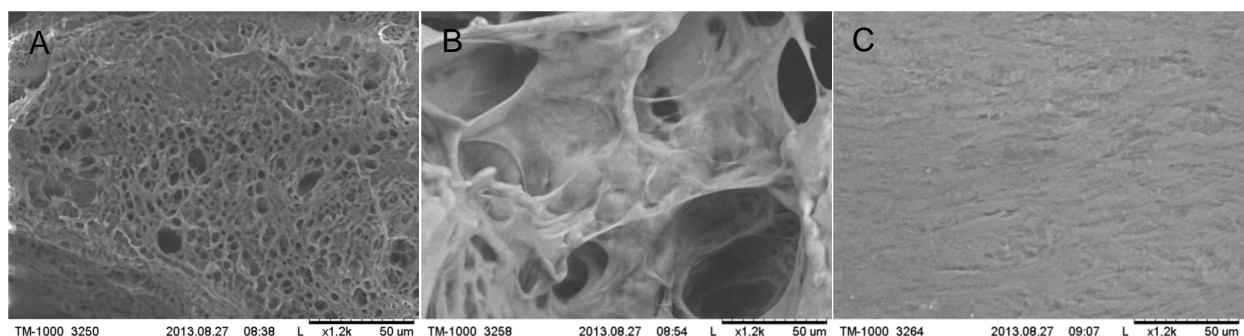


Abbildung 102: REM-Aufnahmen Osteovit®-Material (1200-fache Vergrößerung). A: unbesiedeltes Material; B: besiedeltes Material mit oMSCs Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück; C: Besiedeltes Material ovine MSC Passage 3, 450.000 Zellen pro Materialstück, die Zellen wurden 14 Tage osteogen differenziert.

Durch den osteogenen Differenzierungsprozess der Zellen wurde Hydroxylapatit abgelagert, so dass die Zellkörper unter der mineralischen Schicht verschwunden waren (siehe Abbildung 102 Bild C). Die ovinen Stammzellen zeigten *in vitro* ein sehr gutes Proliferationsverhalten auf dem Osteovit®-Material in Kombination mit einer sehr guten osteogenen Differenzierung, die durch eine hohe mineralische Ablagerung gekennzeichnet war.

1.38 *In-vivo* Anwendung im Schafmodell

Die folgende Beschreibung des Tierexperiments wurde in Auszügen wörtlich bzw. in abgewandelter Form aus dem Abschlussbericht der Fa. Freytox GmbH (Herzberg, Deutschland) übernommen.

1.38.1 Knochenmarkaspiration

Die für die Knochenmarkaspiration gewählte Position am Darmbein (Tuber coxae) erwies sich als funktional um genügend Zellmaterial vom Schaf zu gewinnen. Aus dem Knochenmark wurden anschließend erfolgreich Zellen isoliert, welche im weiteren Versuchsverlauf als MSC charakterisiert werden konnten (siehe 1.38.3).

Tabelle 32: Übersicht der Mengen an entnommenen Knochenmark je Einzeltier (enthalten in Prüfbericht Fa. Freytox GmbH).

Menge[ml] Tier Nr.	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Σ Aspirat
Nr. 91709	4 ml	5 ml	3 ml	4 ml	16 ml
Nr. 91745	8 ml	2 ml	1 ml	-	11 ml
Nr. 91702	4 ml	2 ml	2 ml	-	8 ml
Nr. 91758	6 ml	3 ml	-	-	9 ml

1.38.2 Isolierung und Kultur der ovinen MSC

Die Isolierung der mesenchymalen Stammzellen erfolgte wie unter 1.5 (Isolierung von BM-MSC) beschrieben. Für die Isolierung und Kultur der ovinen MSC wurde FCS-haltiges Medium verwendet (siehe Tabelle 18). Der erste Medienwechsel nach der Primäraussaat erfolgte nach 144 Stunden und dann 2 mal wöchentlich. Die Zellen der Primäraussaat wurden in flüssigem N₂ konserviert um später -kurz vor der Implantation der Prüfgegenstände- in Kultur genommen zu werden. So wurde gewährleistet, dass keine senseszenten Zellen mit reduziertem osteogenen Potential für den Tierversuch verwendet wurden.

1.38.3 Charakterisierung der ovinen MSC

Für ovine MSC sind wie unter 1.3.6.8 beschrieben nur sehr wenige FACS-Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmarker getestet. Daher wurde die MSC-Identität der isolierten Zellen durch Differenzierungsexperimente bestätigt.

Vor der Reimplantation der Zellen in das jeweilige Tier wurde ein Teil der Zellen in Passage 1– parallel zur *in vitro*- Expansionsphase- für Differenzierungsexperimente ausgesät und bei Erreichen der Subkonfluenz (ca. 80%) adipogen, osteogen und chondrogen differenziert. Bei Erreichen der Subkonfluenz wurde die jeweilige Differenzierung durch die Zugabe eines Spezialmediums, welches die entsprechenden stimulierenden Substanzen enthält, gestartet. Bei der chondrogenen Differenzierung wurden die Zellen direkt nach dem Ablösen abzentrifugiert und das chondrogene Differenzierungsmedium zugegeben. Die Zusammensetzung der Medien wurde unter 1.15.1 bis 1.15.4 beschrieben.

So konnte die Stammzellidentität der isolierten ovinen MSC gezeigt werden. Bei den isolierten ovinen Zellen, welche für die Besiedelung der Prüfgegenstände verwendeten wurden, handelt es sich ausnahmslos um Stammzellen. In Abbildung 103 werden exemplarisch die Differenzierungsaufnahmen eines Tiers gezeigt. Alle Knochenmark-Isolate zeigten ein sehr gutes Differenzierungspotential, vor allem die osteogen differenzierten Zellen waren nach dem Anfärben mit Alizarinrot schätzungsweise 100% positiv (siehe Abbildung 103 Bild B). Bei der nach 3 Wochen unter Differenzierung durchgeführten Ölrot-Färbung wurden die Fettvakuolen der adipogen differenzierten MSC rot angefärbt. Die undifferenzierte Negativkontrolle zeigte dagegen keine Anfärbung (siehe Abbildung 103 Bild A und D). Es wurden zwei Färbungen zum Nachweis der Chondrogenese durch MSCs in Micromass-

Pellet-Kulturen durchgeführt. Der Alcianblau-Farbstoff färbt die bei der chondrogenen Differenzierung gebildeten Proteoglykane türkis an (siehe Abbildung 103 Bild F) während bei der Safranin O-Färbung die Matrixbestandteile Glykosaminoglykane und Proteoglykane rot angefärbt werden (siehe Abbildung 103 Bild C).

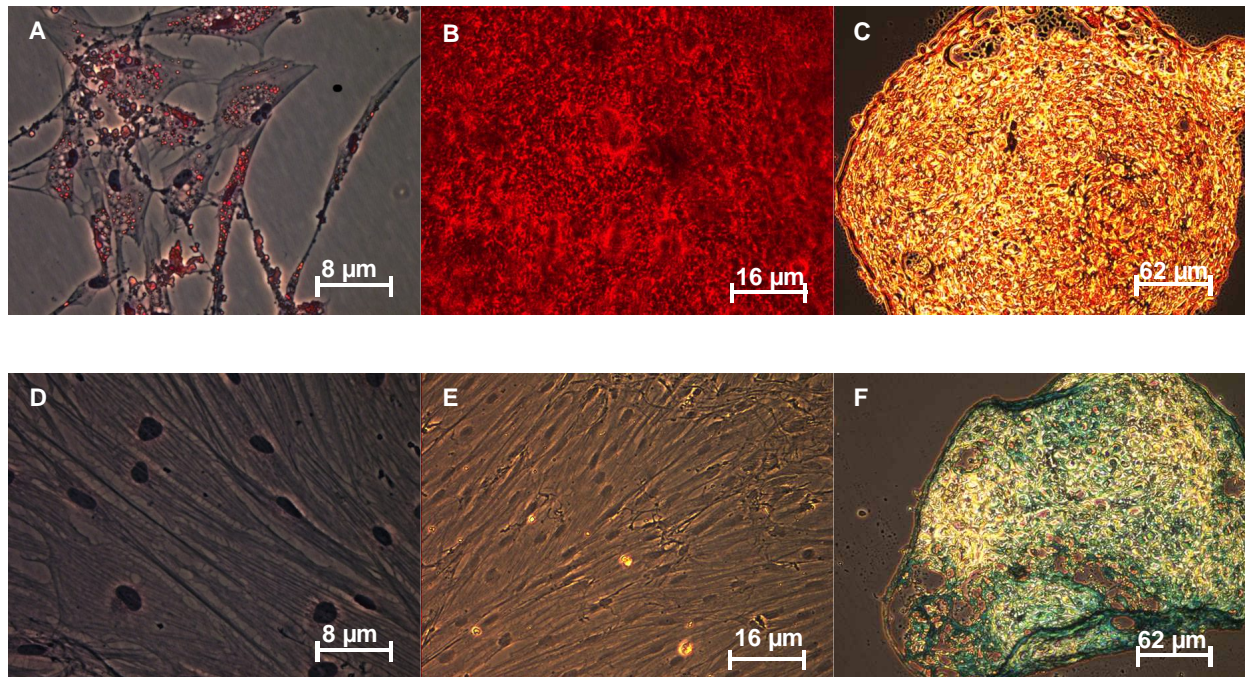


Abbildung 103: Übersicht der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung eines Versuchstiers nach jeweils 21 Tagen Differenzierungszeit. A: adipogen differenziertes oMSC (200-fache Vergrößerung) mit zahlreichen Fettvakuolen. B: osteogen differenziertes oMSC (100-fache Vergrößerung) nach Alizarinrotfärbung. C: Chondrogen differenziertes oMSC (25-fache Vergrößerung) Safranin O gefärbt. D: Negativkontrolle adipogene Färbung. E: Negativkontrolle osteogene Färbung. F: Chondrogen differenziertes oMSC (25-fache Vergrößerung) nach Anfärben mit Alcianblau.

Da für den durchgeführten Tierversuch die osteogene Differenzierungsfähigkeit der ovinen MSC von essentieller Bedeutung war, wurden in Abbildung 104 die *in vitro* Aufnahmen der osteogenen Differenzierungen aller Versuchstiere dargestellt.

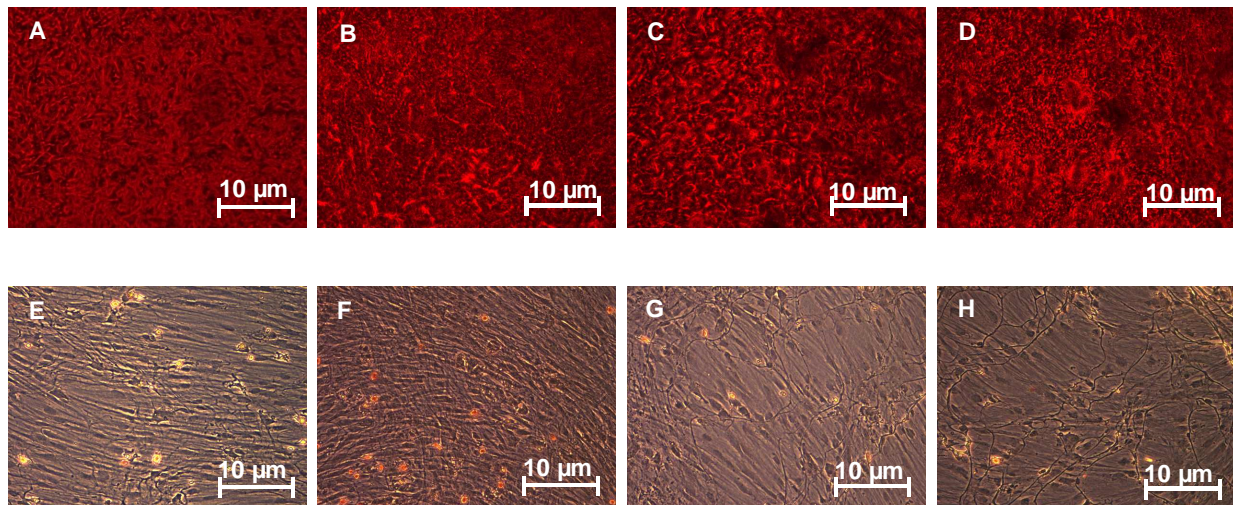


Abbildung 104: Übersicht der osteogenen Differenzierung der ovinen MSC-Isolate aller Versuchstiere bei 100-facher Vergrößerung.

Alle *in vitro* differenzierten Zellen zeigen eine sehr gute Matrixbildung (siehe Abbildung 104 Bild A-D). Die jeweiligen Schaf-MSC ohne osteogene Induktion zeigen hingegen keinerlei Matrixbildung (siehe Abbildung 104 Bild E-H).

1.38.4 Seneszenz der ovinen MSC

Die Zellen wurden in jeder Passage bis zur Subkonfluenz kultiviert, dann abtrypsinisiert und erneut ausgesät (neue Passage siehe Abschnitt 1.12). Der Versuch sollte zeigen wie schnell die ovinen, mesenchymalen Zellen *in vitro* altern, bzw. wie lange sie expandiert werden können.

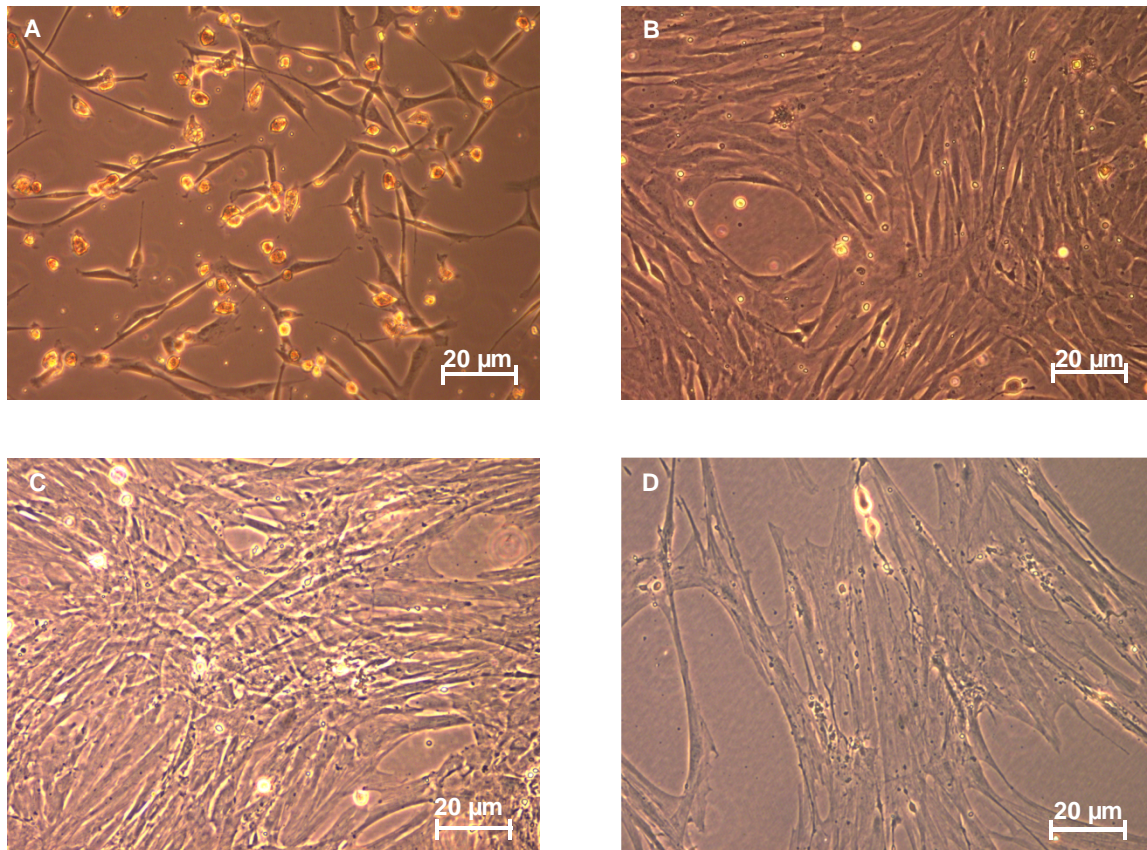


Abbildung 105: Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) von ovinen mesenchymalen Stammzellen in verschiedenen Passagen. A: Passage 0, B: Passage 1, C: Passage 4 und D: Passage 5.

Nach Passage 5 trat eine „Seneszenz“ der Zellen ein: die ovinen Stammzellen zeigen ein deutlich schwächeres Wachstum wie in den früheren Passagen, außerdem kam es zu einer Veränderung der Morphologie der Zellen (viel größer als in den frühen Passagen siehe Abbildung 105). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für den Tierversuch möglichst „junge“ Zellen eingesetzt d.h. Zellen aus der Primärkultur wurden in flüssigem N₂ eingefroren. Kurz vor der Reimplantation wurden die Zellen in Kultur genommen (Passage 1) um die Zellen zu reaktivieren. Auf allen Prüfgegenständen wurden dann Zellen der Passage 2 verwendet (wären die Zellen kontinuierlich in Kultur geblieben bis zur Reimplantation auf den PU-Schäumen wären die Zellen in Passage 5- 6 im Tierversuch eingesetzt worden und damit im seneszenten Zustand).

1.38.5 Überprüfung der Vitalität der oMSC nach Besiedelung und Transport

Die Zellen wurden für den Tierversuch aufgetaut und in Kultur genommen. Bei Erreichen der Subkonfluenz (70 – 80%) wurden die Zellen abtrysiniert und es erfolgte die Besiedelung der PU-Implantate (konventionelle Besiedelungsmethode). Pro PU-Schaum wurden insgesamt 6 Mio Zellen verwendet (3 Mio auf der Oberseite, nach einer Adhäsionszeit von ca. 2 Stunden wurden die Schäume um 180° gedreht und die andere Seite mit ebenfalls 3 Mio Zellen besiedelt). Nach einer weiteren Adhäsionsphase von 2 Stunden wurden die besiedelten PU-Schäume vorsichtig mit Kulturmedium überschichtet. Da die Polyurethan-Schäume einen starken Auftrieb in wässrigem Medien zeigten, wurden die Schäume mittels Kanülen fixiert um den PU-Schaum während der gesamten Kultur bzw. auch während des Transports im Medium zu halten (ein Aufschwimmen der Schwämme an die Oberfläche würde analog mit einem Absterben der Zellen aufgrund von Mangel an Kulturmedium sowie Austrocknen bedeuten). Während des Transportes konnten durch diese Fixierungsmethode das Aufschwimmen von allen besiedelten Prüfgegenständen (3x je Schaf also insgesamt 12 besiedelte PU-Schäume) verhindert werden. In Abbildung 106 wird ein besiedelter PU-Schaum gezeigt. Die Kultur der Schäume, jeder Medienwechsel sowie das Waschen der Schäume mit PBS-Lösung (2-malig vor dem Einsetzen in das Tier) fand stets in den gezeigten Gefäßen statt, durch das Umsetzen der Prüfgegenstände in neue Behälter mit frischem Kulturmedium bzw. PBS-Lösung. Das 2- malige Waschen vor dem Einsetzen in den Implantationssitus war erforderlich damit sämtliche Rückstände des FCS-supplementierten Kulturmediums entfernt wurden um allergische Reaktionen zu vermeiden.



Abbildung 106: Aufnahme eines besiedelten Prüfgegenstandes zur Demonstration des Versuchsaufbaus.

24 Stunden nach der Besiedelung der Schäume erfolgte der Transport der besiedelten Prüfgegenstände in den gezeigten Behältern nach Herzberg, Brandenburg (Proben auf Kühlakkus, Dauer des Transports ca. 8-12 Stunden). Um zu gewährleisten, dass sich die Zellen auf dem Implantat nach dieser Zeit in einem guten d.h. vitalen Zustand befanden bevor sie den Schafen eingesetzt wurden, wurde von einem der besiedelten Poyurethanschäume eine Vitalitätsfärbung mittels Alamar Blue-Farbstoff durchgeführt (pro Schaf wurden drei besiedelte Prüfgegenstände geschickt: ein PU-Schaum für das Einsetzen in den Implantationssitus, ein „Ersatz“-Schaum und ein Schaum für die Überprüfung der Vitalität). Bei dieser Färbemethode werden vitale Zellen blau angefärbt. In Abbildung 107 wurde der angefärbte PU-Schaum eines Schafes gezeigt. Die Zellen auf dem PU-Schaum waren deutlich blau angefärbt, was auf einen guten Vitalitätszustand der ovinen MSC hinweist. Außerdem kann man erkennen, dass die Zellen homogen über das gesamte Material verteilt waren.



Abbildung 107: besiedelter PU-Schaum nach Transport angefärbt mit Alamar Blue-Farbstoff für Vitalitätsnachweis und anschließender Fixierung in 4%-iger FA-Lösung. Linkes Bild: Aufsicht ; Rechtes Bild: untere Besiedelungsseite.

Es gibt nur wenige Bereiche, die eine etwas hellere Färbung d.h. weniger Zellen aufwiesen. Für das *in-vivo* Schafexperiment wurden dementsprechend funktionelle ovine Stammzellen eingesetzt, die gleichmäßig auf der Materialaußenseite verteilt vorlagen.

1.38.6 Implantation und postoperative Beobachtungszeit

Tabelle 33: Studienbasierter Zeitplan mit Übersicht über die operativen Eingriffe, Rekonvaleszenzzeiten, Röntgenuntersuchungen sowie makroskopische Untersuchungen (entnommen aus Prüfplan der Fa. Freytox GmbH).

Tier.Nr.- Studienabschnitt	Nr. 91716	Nr. 91709	Nr. 91745	Nr. 91702	Nr. 91758
Knochenmarkentnahme	-	d0-Aspiration	d0-Aspiration	d0-Aspiration	d0-Aspiration
Rekonvaleszenz	d0- Operation	4 Wochen	4 Wochen	4 Wochen	4 Wochen
Operation	RÖ 4 Wochen	d0-Operation	d0-Operation	d0-Operation	d0-Operation
Röntgen (RÖ) und Sektion (SKT)	RÖ 8 Wochen	RÖ 4 Wochen	RÖ 4 Wochen	RÖ 4 Wochen	RÖ 4 Wochen
	RÖ 12 Wochen	RÖ 8 Wochen	RÖ 8 Wochen	RÖ 8 Wochen	RÖ 8 Wochen
	RÖ 12 Wochen	RÖ 12 Wochen	RÖ 12 Wochen	RÖ 12 Wochen	RÖ 12 Wochen
	SKT 12 Wochen	-	RÖ 18 Wochen	RÖ 18 Wochen	RÖ 18 Wochen
	SKT 12 Wochen	SKT 12 Wochen	-	RÖ 24 Wochen	RÖ 24 Wochen
			SKT 21 Wochen	RÖ 29 Wochen	RÖ 29 Wochen
				SKT 30 Wochen	RÖ 39 Wochen
					SKT 39 Wochen
Sektion <i>post operationem</i> (Angabe in Monaten)	3	3	5,25	7,5	9,75

Gemäß der Dokumentation des durchführenden tierexperimentellen Labors verlief die Aufwachphase bei allen Tieren unproblematisch. Generell wiesen die Schafe ab Tag 1 nach dem Eingriff ein ungestörtes, physiologisches Allgemeinbefinden auf, in Kombination mit einer normalen Futteraufnahme sowie einem normalen Kotabsatz. Nur bei Tier Nr. 91702 wurde am ersten und zweiten postoperativen Tag ein Analgetikum (Buprenorphin) gegeben, wobei eine Fortsetzung der Schmerztherapie ab Tag 3 *post operationem* nicht mehr erforderlich war. Alle Tiere wurden am ersten und zweiten postoperativem Tag prophylaktisch mit einem antimikrobiell wirkenden Agens (Sulfamethosypyridazin) behandelt. Die Wunden zeigten im weiteren Verlauf einen unauffälligen Heilungsverlauf, so traten keinerlei pathologische Befunde oder Wundheilungsstörungen auf.

Das Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin bestätigte die erfolgreiche Isolierung, Expansion und Charakterisierung der ovinen MSC aus den Knochenmarkaspiraten der einzelnen Versuchstiere sowie eine erfolgreiche Besiedelung der Prüfgegenstände mit den individuellen Stammzellen.

1.38.7 Vorbereitung des Implantationsbettes

Die Implantationsbetten wurden unabhängig vom zum applizierenden Prüfmuster in der gleichen Art und Weise vorbereitet. Nach der palpatorischen Darstellung des Tuber coxae wurde dieses durch einen Hautschnitt freigelegt. Ferner wurden die Seitenwände der Ala ossis ilii präpariert. Für die adäquate Vorbereitung der Implantationsbetten wurde stets der Prüfgegenstand 1 als Schablone genutzt, die eine Größe von 2,1 x 1,0 x 1,4 cm und eine Dicke von ca. 0,4 cm aufwies. Initial wurde die Knorpelschicht scharf getrennt und abgetragen, wobei eine sagittale Tiefe

von ca. 0,5 cm für diese Schicht ermittelt wurde. Nachfolgend wurde der Knochen keilförmig in die Tiefe präpariert (ca. $1,5 \leq x \leq 2,0$ cm). Die Applikation des jeweiligen Prüfmusters erfolgte unmittelbar nach Fertigstellung des Implantationsbettes (aus dem Prüfbericht der Fa. Freytox GmbH).

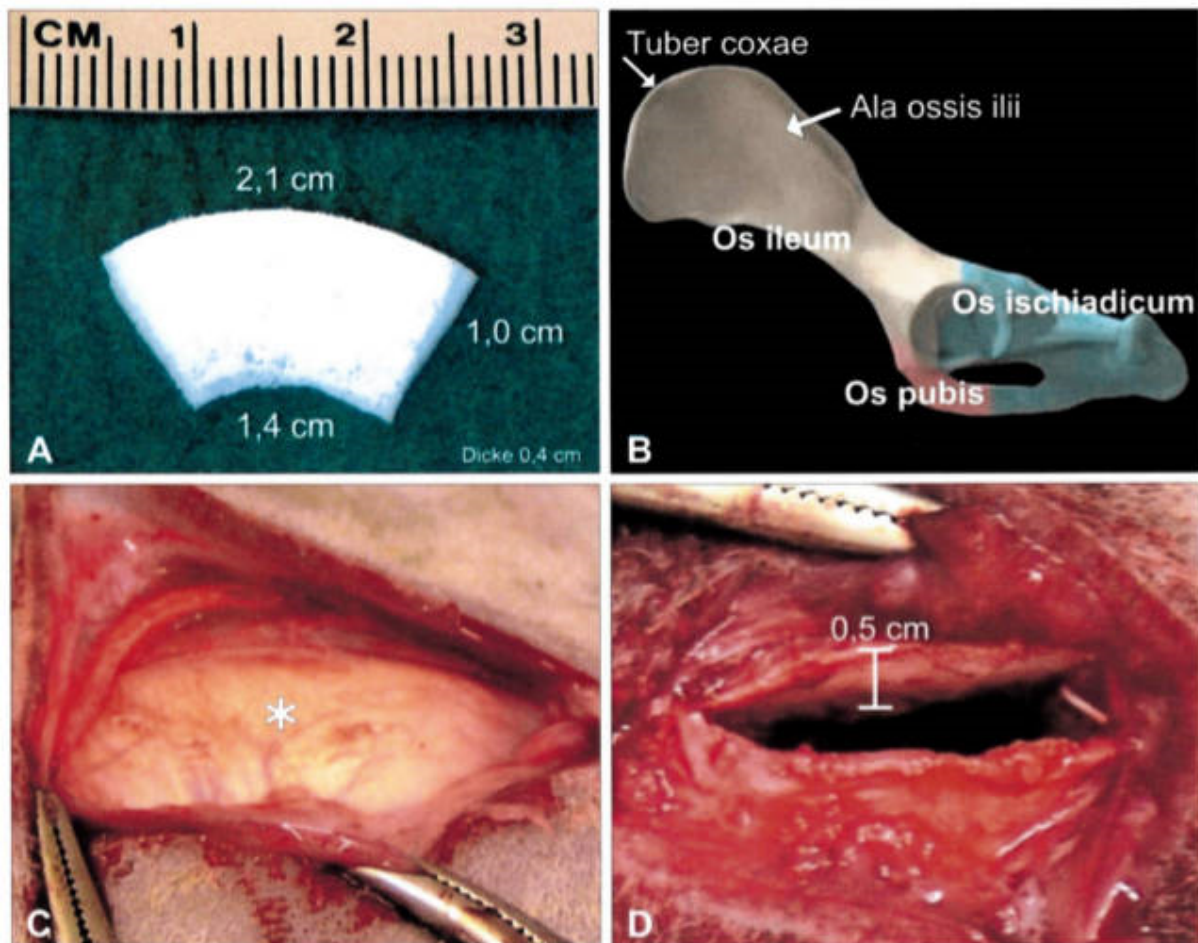


Abbildung 108: Präparation des Applikationssitus sowie angewendete Schablone. (A): Schablone mit Maßangaben, (B): Anatomie des Beckens, (C): freigelegtes Tuber coxae (*), (D): Implantationssitus mit Kennzeichnung der Knorpelschicht (0,5 cm) (Quelle: Fa. Freytox GmbH).

1.38.8 Applikation des Prüfgegenstandes 1 und 2

Der unbesiedelte Prüfgegenstand 1 (Polyurethanschaum) wurde als fest, jedoch elastisch-weich und formbar beschrieben. Außerdem wurde eine Materialseite als makroskopisch glatt beschrieben, während die Fläche der zweiten Seite Poren multipler Größe aufzeigte. Der besiedelte Prüfgegenstand 2 wurde mit Kanülen beschwert sowie allseitig mit Zellkulturmedium umgeben in sterilen Gefäßen bis zur Implantation bei 37 °C, 5% CO₂ kultiviert (siehe Abbildung 106). Die Entnahme des jeweiligen Prüfgegenstandes mittels steriler Pinzette konnte laut der durchführenden Tierärztin gut gemacht werden. Der besiedelte PU-Schaum wurde als weiß, fest und elastisch beschrieben. Die Matrix der Prüfgegenstände war mit Flüssigkeit vollgesogen. Auch war der PU-Schaum generell durch eine konvexe Oberseite, eine konkave Unterseite sowie angeschrägten Längsseiten charakterisiert.

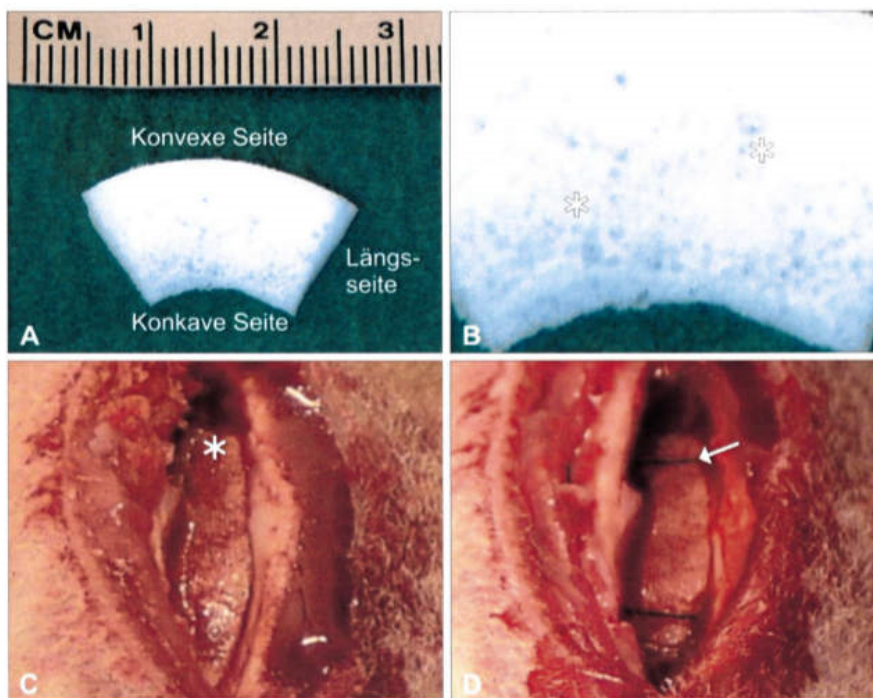


Abbildung 109: Applikationssitus des Prüfgegenstandes 1 und 2. (A): Prüfgegenstand 1, (B): Detailansicht Prüfgegenstand 1: multiple Porenstruktur auf der Oberfläche (*), (C): applizierter Prüfgegenstand (*), (D): transkorticale Fixierung des Prüfgegenstandes (Pfeil) (Quelle: Freytox GmbH).

In den nachfolgenden Tabellen wird eine Übersicht über verschiedene Parameter (Implantationssitus, Größe des Situs, Applikation und Verhalten des PU-Schaums in situ sowie Fixation des Schaums) der einzelnen Versuchstiere über die jeweilige (individuelle) Studiendauer gegeben.

Tabelle 34: Individuelle intraoperative Beobachtungen zu Tier 91709 (verändert nach Prüfbericht Fa. Freytox GmbH).

Tier Nr. 91709 Individuelle Studiendauer von 12 Wochen <i>post operationem</i>		
Implantationssitus	Tuber coxae links	Tuber coxae rechts
Prüfgegenstand (PG)	Polyurethanschaum, unbesiedelt	Polyurethanschaum, besiedelt
Größe [cm]*	2,1 x 1,0 x 1,2 // Dicke: 0,4 cm	2,2 x 1,4 x 1,3 //Dicke: 0,5 cm
Applikation	Elastisch in Defekt appliziert	Elastisches Verhalten Austritt von weißem Schaum aus den Poren bei Applikation
Verhalten <i>in situ</i>	Blutaufnahme in Material mit makroskopischer Sättigung Blutaustritt durch die Poren des unbesiedelten Schaums bei Druckausübung auf das Material Keine hämostyptische Wirkung Schaum tendiert zum spontanen Herausgleiten aus dem Implantationsbett	Ausübung von sehr geringgradigem Druck (< 1min) bewirkt Platzierung, Verhinderung von elastischem Herausgleiten des besiedelten Schaums aus Implantationssitus
Fixation	Transkortikale Befestigung ohne Einbezug der Matrix	Transkortikale Fixierung

*Größenangaben in cm stets als ungefährer Wert

Tabelle 35: Individuelle intraoperative Beobachtungen zu Tier 91745 (verändert nach Prüfplan Fa. Freytox GmbH).

Tier Nr. 91745 individuelle Studiendauer von 21 Wochen <i>post operationem</i>		
Implantationssitus	Tuber coxae links	Tuber coxae rechts
Prüfgegenstand (PG)	Polyurethanschaum, besiedelt	Polyurethanschaum unbesiedelt
Größe [cm] *	Keine Angabe	2,0 x 1,0 x 1,1 // Dicke: 0,4 cm
Applikation	<p>Sehr geringgradige Ausprägung des Knorpelkammes</p> <p>Bei Applikation in Implantationsbett erfolgte Austritt von weißem Schaum aus den Poren des Schaums</p>	<p>Feste Platzierung im Implantationssitus</p>
Verhalten <i>in situ</i>	<p>Elastisches Aufschwimmen im Implantationsbett</p> <p>In Folge Manipulation bei Verankerung: Anbrechen der Matrix des besiedelten Schaums</p>	<p>Blutaufnahme in Material mit makroskopischer Sättigung</p> <p>Blutaustritt durch die Poren des unbesiedelten Schaums.</p> <p>Keine hämostyptische Wirkung</p> <p>Der Schaum verbleibt gut im Implantationsbett</p>
Fixation	<p>Schwierige Fixation durch Situsanatomie trotz ausreichend tiefer und breiter Präparation des Implantationsbettes.</p> <p>Befestigung der Polypropylenfäden in der Faszie</p>	<p>Transkortikale Fixierung gut möglich</p>

*Größenangaben in cm stets als ungefähre Wert

Bei Tier Nr. 91745 konnten trotz gleicher Chargennummer der Schablone und des zu implantierenden unbesiedelten Schaums Unterschiede in der Form und Größe festgestellt werden, die auch einen Einfluss auf die Implantationsfähigkeit hatten.

Tabelle 36: Individuelle intraoperative Beobachtungen zu Tier 91702. * Größenangaben in cm stets als ungefähre Wert (verändert nach dem Prüfplan Fa. Freytox GmbH).

Tier Nr. 91702 individuelle Studiendauer von 30 Wochen <i>post operationem</i>		
Implantationssitus	Tuber coxae links	Tuber coxae rechts
Prüfgegenstand (PG)	Polyurethanschaum, besiedelt	Polyurethanschaum, unbesiedelt
Größe [cm]*	Länge 2 cm//Dicke: 0,4 cm (schwer bestimmbar, da schlecht zu fixieren)	2,0 x 1,0 x 1,2 //Dicke: 0,4 cm
Applikation	Schaum wurde elastisch in Defekt platziert Austritt großer Mengen von Flüssigkeit bei Applikation und Manipulation	Gutes Einpassen in Implantationsbett Verbleiben des Schaums im Implantationssitus
Verhalten <i>in situ</i>	Der Schaum verbleibt nicht in der Tiefe des Implantationsbettes (trotz ausreichender Präparation des Situs), es konnte ein Aufschwimmen des Materials beobachtet werden.	Blutaufnahme in Material mit makroskopischer Sättigung Es kam zum Blutaustritt durch die Poren des unbesiedelten Schaums. Keine hämostyptische Wirkung
Fixation	Transkortikale Befestigung unter Einbezug der Matrix Der besiedelten Schaum wurde trotz Fixation nicht vollständig im Implantationssitus gehalten (Der Schaum war gekennzeichnet durch eine sehr elastische Form und zudem stark mit Flüssigkeit gefüllt)	Transkortikale Fixierung

Tabelle 37: Individuelle intraoperative Beobachtungen zu Tier 91758. * Größenangaben in cm stets als ungefähre Wert. (verändert nach dem Prüfplan der Freytox GmbH).

Tier Nr. 91758 individuelle Studiendauer von 39 Wochen <i>post operationem</i>		
Implantationssitus	Tuber coxae links	Tuber coxae rechts
Prüfgegenstand (PG)	Polyurethanschaum, unbesiedelt	Polyurethanschaum, besiedelt
Größe [cm]	Keine Angabe	Keine Angabe
Applikation	Festes Verbleiben des Schaums im Implantationssitus unterhalb der Knorpel- / Knochengrenze auch vor Fixierung	Gute Passform Austritt großer Mengen von Flüssigkeit bei der Applikation und Manipulation des Prüfgegenstandes
Verhalten <i>in situ</i>	Blutaufnahme in das Material mit makroskopischer Sättigung sichtbar Blutaustritt durch die Poren des Schaums Keine hämostyptische Wirkung	Elastisches Aufschwimmen im Implantationssitus Herausgleiten aus Implantationsbett (begünstigt vermutlich durch die Materialelastizität, den hohen Flüssigkeitsgehalt sowie die Oberflächenbeschaffenheit des Prüfmaterials.)
Fixation	Sehr gute transkortikale Fixierung	Transkortikale Befestigung ohne Einbezug der Matrix

1.38.9 Applikation des Referenzgegenstandes Osteovit®

Der Referenzgegenstand Osteovit® (RG) wurde in einer Doppel-Peelverpackung steril eingeschweißt. Das Material wurde als fest, porös und spröde mit rauher Oberfläche charakterisiert. Der Zuschnitt des Osteovit®-Materials erfolgte analog der Form des Polyurethan-Schaums unter Vernachlässigung des konkaven sowie konvexen Erscheinungsbilds der oberen und unteren Längseiten des PU-Schaums. Die Größe des Zuschnitts betrug 2,0 x 1,0 x 1,0 cm. Bei der Durchführung des Osteovit®-Zuschnittes splitterten bzw. faserten Anteile aus dem Materialverbund des Referenzgegenstandes ab.

Gemäß der Dokumentation des Prüflabors verhielt sich das Referenzmaterial Osteovit® bei der Applikation initial starr und wurde im Zuge des Blutkontaktes weich sowie formbar. Bei der Platzierung des Referenzgegenstandes konnte sowohl eine hämostyptische Wirkung als auch ein Schrumpfen des Materials im Implantationssitus beobachtet werden. Daher füllte das Osteovit®-Material das Implantationsbett nicht mehr vollständig aus, so dass weiteres Material eingebracht werden musste. Der Knochendefekt der Spongiosa im Darmbeinflügel wurde bis zum Knochen-/Knorpelübergang mit Osteovit®-Material ausgefüllt.

Das Tier Nr. 91716 wurde beidseits mit dem unbesiedelten Osteovit®-Material behandelt (Studiendauer 12 Wochen *post operationem*) (verändert nach Freytox GmbH).

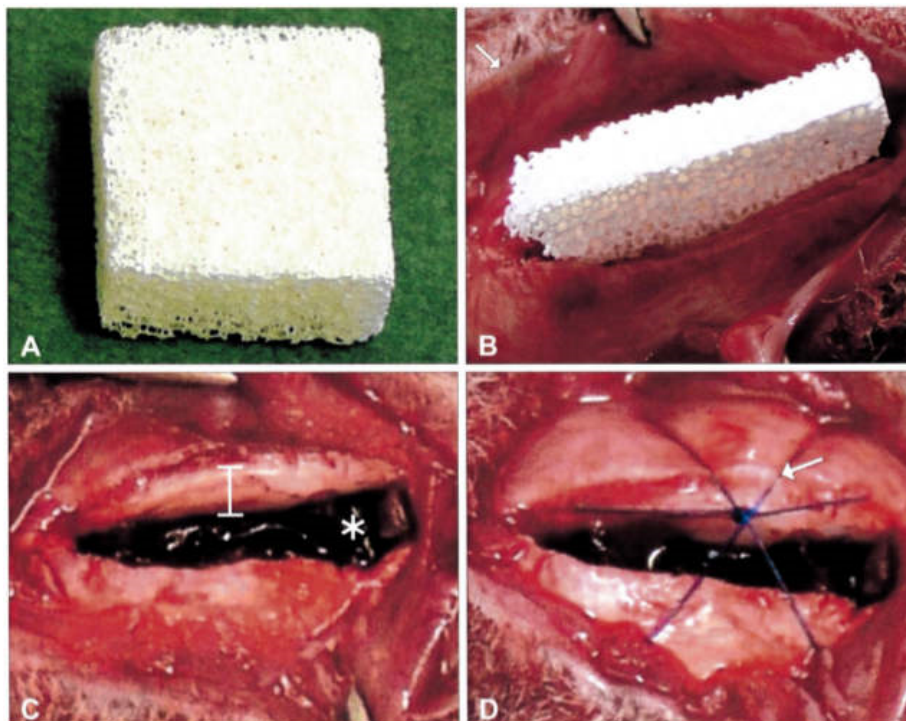


Abbildung 110: Applikationssitus des Referenzgegenstandes. (A): Referenzgegenstand, (B): Applikation des RG in das Implantationsbett, (C): applizierter RG (*), (D): Polypropylen-basierte Fixationsnaht (Pfeil)
Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH.

1.38.10 Röntgenologische Befunde

Die Implantationssitus wurden bei jedem Schaf regelmäßig über die jeweilige Studiendauer röntgenologisch überwacht (siehe Übersicht Tabelle 33). Generell ist anzuführen, dass die röntgenologische Darstellung des Hüfthöckers als Teil des Beckens beim kleinen Wiederkäuer durch die Nähe zum Pansen erschwert war (insbesondere der linken Seite). Es kam in den Projektionen teilweise zu einer Überlagerung durch den stets mit Ingesta und Gas gefüllten Pansen (trotz Nüchterung und dem Legen einer Pansenschlundsonde). Die laterolaterale Projektion zeigte sich dabei günstiger im Vergleich zur dorsoventralen Projektion. Das unbehandelte Darmbein (Tuber coxae) war in allen Fällen durch eine ubiquitär einheitliche Röntgendichte charakterisiert. Die Spongiosa war durch deren Trabekelzeichnung gut darstellbar. Für die Beurteilung der röntgenologischen Befunde wurde besonders auf die Röntgendichte der Strukturen geachtet, da diese ein Maß für die Knochenneubildung und –regeneration ist. Abschließend ist anzuführen, dass die Auswertung der röntgenologischen Befunde verblindet vorgenommen wurde (verändert nach Prüfplan Fa. Freytox GmbH).

1.38.10.1 Referenzgegenstand Osteovit®

Die Implantationssitus des Referenzmaterials Osteovit®, welche als kelch- bzw. tropfenförmig beschrieben wurden, stellten sich 4 Wochen *post operationem* durch eine regional reduzierte Röntgendichte dar, wobei nur sehr geringe Änderungen nach 8 postoperativen Wochen festgestellt werden konnten (siehe auch Abbildung 111). Nach 12 Wochen *post operationem* waren vor allem die Außenbereiche des

Implantationsbettes sowie dessen bauchwärts gerichteten Areale von einer Zunahme der Röntgendichte und somit einer zunehmenden Kalzifizierung gekennzeichnet. Die röntgenologischen Befunde des Referenzgegenstandes sind nachfolgend chronologisch in Tabelle 38 aufgeführt.

Tabelle 38: Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde des Tieres 91716 (beidseitig implantierter RG Osteovit®).IS: Implantationssitus,(verändert nach dem Prüfbericht Fa. Freytox GmbH).

Tier 91716	Linkes Tuber coxae, unbesiedeltes Osteovit®- Material	Rechtes Tuber coxae, unbesiedeltes Osteovit®- Material
nativ	Ubiquitäre homogene Röntgendichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelezeichnung ansprechbar Dorsale Breite 1,4 cm (d/v- Projektion)	Ubiquitäre homogene Röntgendichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelezeichnung ansprechbar Dorsale Breite 1,1 cm (d/v- Projektion)
4 Wochen <i>post operationem</i>	Areal des Implantationssitus mit lokal verminderter Röntgendichte (ca. 1,0 x 1,0 cm)	Areal des Implantationssitus mit lokal verminderter Röntgendichte Dorsale Oberfläche des Implantationssitus mit eingezogenem Erscheinungsbild
8 Wochen <i>post operationem</i>	Areal des Implantationssitus mit lokal verminderter Röntgendichte, teilweise streifig erscheinend	Analog zu den Befunden von 4 Wochen <i>post operationem</i>
12 Wochen <i>post operationem</i>	Implantationssitus-Breite ca. 1,1 cm, sagittale Tiefe ca. 1,2 cm Implantationssitus (IS) durch kelchförmiges Aussehen und verschiedene Röntgendichten charakterisiert Ventral> zentral> dorsal Dorsal geringste Röntgendichte, dreieckiges Erscheinungsbild	Implantationssitus-Breite ca. 0,5 bis 0,8 cm, IS sagittale Tiefe ca. 1,5 cm IS durch tropfenförmiges Aussehen gekennzeichnet mit vermehrt röntgendichten Randstrukturen, zentrales Areal mit geringster RÖ-Dichte Pheriphere zum Implantationssitus durch physiologische Spongiosa gekennzeichnet

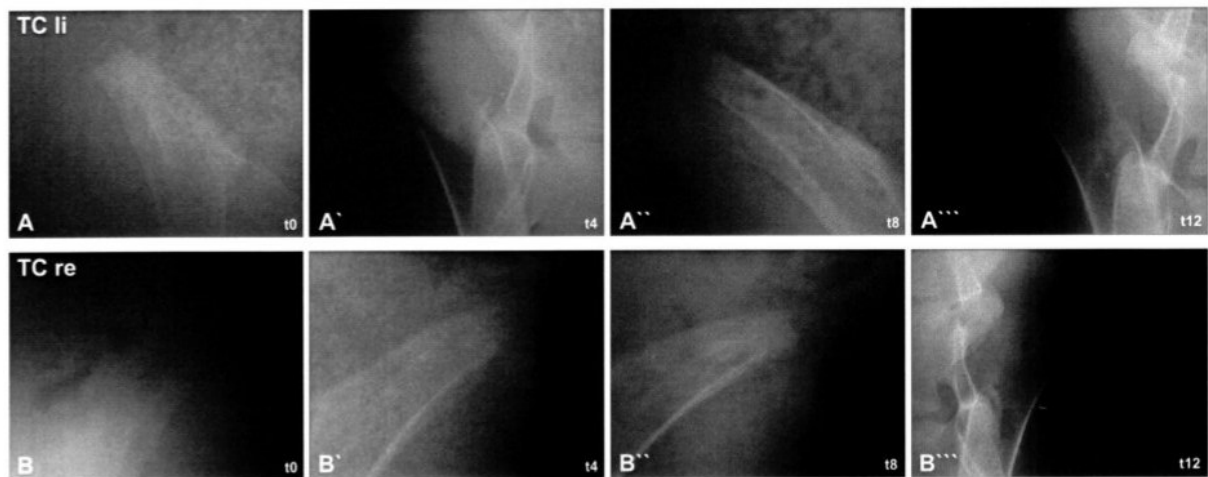


Abbildung 111: Röntgenologische Befunde Tier 91716. (A bis A'''): Tuber coxae links (TC li), (B bis B'''): Tuber coxae rechts (TC re). [t (Zeit) in Wochen] (Quelle: Freytox GmbH)

In Abbildung 111 sind die Röntgenaufnahmen von Tier Nr. 91716 über den Zeitraum von 12 Wochen dokumentiert. Im rechten und linken Tuber coxae wurde jeweils der unbesiedelte Referenzgegenstand Osteovit® implantiert. Aus Tabelle 38 kann eine detaillierte Beschreibung der Röntgenbilder entnommen werden.

1.38.10.2 Prüfgegenstand Polyurethanschaum zellbesiedelt bzw. unbesiedelt

Tier Nr. 91709

Die nachfolgende Tabelle 39 beschreibt eine Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde von Tier Nr. 91709 über den Versuchszeitraum von 12 Wochen.

Tabelle 39: Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde des Tieres 91709, (verändert nach Prüfplan Fa. Freytox GmbH). IS:Implantationssitus;RÖ-Dichte:Röntgendichte

Tier 91709	Linkes Tuber coxae, unbesiedelter Polyurethanschaum	Rechtes Tuber coxae, besiedelter Polyurethanschaum
nativ	Ubiquitäre homogene RÖ-Dichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelzeichnung ansprechbar	Ubiquitäre homogene RÖ-Dichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelzeichnung ansprechbar
4 Wochen <i>post operationem</i>	Areal des Implantationssitus zentral gefüllt erscheinend, mit verminderter Röntgendichte im Vergleich zu ventral, RÖ-Dichte insbesondere lateral vermindert (ca. 0,5x 0,5 cm) IS leicht gekörntes Aussehen	IS-Breite ca. 0,5 cm, IS sagittale Tiefe ca. 0,8 cm IS schräg projiziert IS mit verminderter RÖ-Dichte im Vergleich zu ventral
8 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 4 Wochen <i>post operationem</i>	Knochenstruktur direkt um IS saumartig verdichtet erscheinend IS-Breite ca. 0,5 cm
12 Wochen <i>post operationem</i>	RÖ-Dichte des IS reduziert gegenüber physiologischen ventralen Arealen, jedoch vermehrt im Vergleich zu 4 und 8 Wochen <i>post operationem</i> <i>IS weiterhin mit leicht gekörntem Aussehen</i> <i>Dorsale Oberfläche des IS leicht eingezogen mit einem zunehmend röntgendichten Saum</i>	Saumartige Knochenstruktur erscheint vermehrt verdichtet im Vgl. zu 8 Wochen <i>post operationem</i> <i>Zunahme der RÖ-Dichte im zentralen Areal des IS</i>

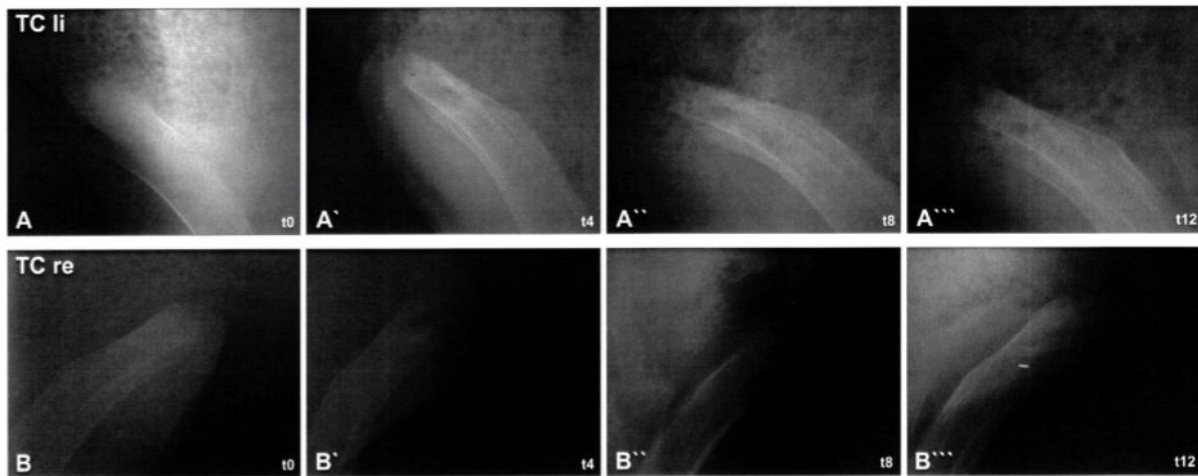


Abbildung 112: Röntgenologische Befunde Tier 91709. (A bis A'''): Tuber coxae links (TC li), (B bis B'''): Tuber coxae rechts (TC re). [t (Zeit) in Wochen]. TC li: unbesiedelter Prüfgegenstand; TC re: besiedelter Prüfgegenstand (Quelle: Freytox GmbH).

In Abbildung 112 sind die Röntgenaufnahmen von Tier Nr. 91709 über den Zeitraum von 12 Wochen dokumentiert. Im linken Tuber coxae wurde der unbesiedelte PU-Schaum implantiert (obere Bildreihe), im rechten Tuber coxae wurde der zellbesiedelte Polyurethanschaum implantiert (untere Bildreihe). Aus Tabelle 39 kann eine detaillierte Beschreibung der Röntgenbilder entnommen werden.

Tier Nr. 91745

In Tabelle 40 ist der röntgenologische Heilungsverlauf von Tier Nr. 91745 über den Zeitraum von 18 Wochen dokumentiert. Bei diesem Tier diente das linke Tuber coxae als Implantationssitus für den zellbesiedelten Prüfgegenstand; das rechte Tuber coxae wurde für den unbesiedelten Polyurethanschaum verwendet.

Tabelle 40: Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde des Tieres 91745 (nativ bis 18 Wochen *post operationem* (verändert nach Prüfplan Fa. Freytox GmbH).

Tier 91745	Linkes Tuber coxae, zellbesiedelter Polyurethanschaum	Rechtes Tuber coxae, unbesiedelter Polyurethanschaum
nativ	Ubiquitäre homogene RÖ-Dichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelzeichnung ansprechbar	Ubiquitäre homogene RÖ-Dichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelzeichnung ansprechbar
4 Wochen <i>post operationem</i>	IS-Breite ca. 0,7 cm, IS sagittale Tiefe ca. 1,1 cm IS zentral mit verminderter RÖ-Dichte im Vergleich zu ventral IS kelchförmiges Aussehen	IS-Breite ca. 0,5 cm, IS sagittale Tiefe ca. 1,0 cm IS mit Struktur von verminderter RÖ-Dichte ausgefüllt erscheinen IS halbovales Aussehen
8 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu den Befunden von 4 Wochen <i>post operationem</i>	IS von dezentem, röntgendichten Saum umgeben IS zentral ohne Unterschied zu 4 Wochen <i>post operationem</i>
12 Wochen <i>post operationem</i>	IS-Breite nicht bestimmbar aufgrund schräger Projektionen, IS sagittale Tiefe ca. 1,1 cm IS umgeben von röntgendichtem und linearen Saum insbesondere an ventromedialer Seite, dorsaler Rand nicht von Saum erreicht Saumbreite ca. 0,06 cm	Röntgendichter Saum nicht mehr zu erkennen IS zentral unverändert zu 8 Wochen <i>post operationem</i>
18 Wochen <i>post operationem</i>	Befunde ähnlich zu 12 Wochen <i>post operationem</i> <i>Röntgendichter Saum weiter nach dorsal reichend, ventrale Hälfte geringgradig röntgendichter im Vgl. zu 12 Wochen post operationem</i> <i>Röntgendichter Saum breiter und ausstrahlender erscheinend (Breite ca. 0,1 mm)</i>	Röntgendichter Saum nicht mehr zu erkennen IS zentral dezent fransiges Erscheinungsbild

TC: Tuber coxae, IS: Implantationssitus, RÖ-Dichte: Röntgendichte

Die nachfolgende Abbildung 113 zeigt die angefertigten Röntgenbilder von Tier Nr.

91745 über den Zeitraum von 18 Wochen. Eine detaillierte Beschreibung der Aufnahmen kann man Tabelle 40 entnehmen.

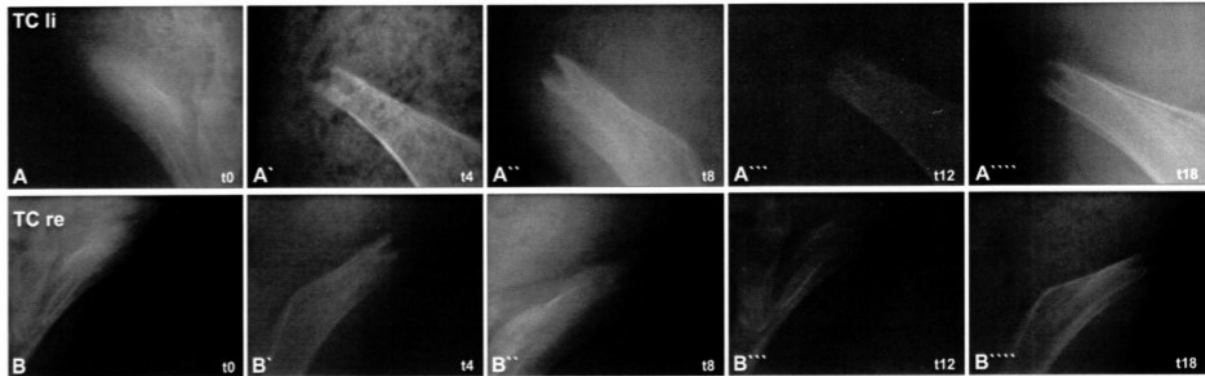


Abbildung 113: Röntgenologische Befunde Tier 91745. (A bis A''): Tuber coxae links (TC li), (B bis B''): Tuber coxae rechts (TC re). [t (Zeit) in Wochen] (Quelle: Freytox GmbH).

Tier Nr. 91702

Der röntgenologische Heilungsverlauf von Tier Nr. 91702 über den Zeitraum von 29 Wochen wurde in Tabelle 41 dargestellt. Bei diesem Tier diente das linke Tuber coxae als Implantationssitus für den besiedelten Polyurethanschaum während im rechten Tuber coxae der unbesiedelte Schaum plaziert wurde.

Tabelle 41: Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde des Tieres 91702 (nativ bis 29 Wochen *post operationem*. (verändert nach Prüfplan Freytox GmbH).

Tier 91702	Linkes Tuber coxae, besiedelter Polyurethanschaum	Rechtes Tuber coxae, unbesiedelter Polyurethanschaum
nativ	Ubiquitäre homogene RÖ-Dichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelzeichnung ansprechbar	Ubiquitäre homogene RÖ-Dichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelzeichnung ansprechbar
4 Wochen <i>post operationem</i>	IS-Breite ca. 0,6 cm, IS sagittale Tiefe ca. 1,4 cm IS mit verminderter RÖ-Dichte im Vergleich zu ventral	IS-Breite ca. 0,5 cm, IS sagittale Tiefe ca. 1,3 cm IS mit verminderter RÖ-Dichte im Vgl. zu ventral
8 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 4 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 4 Wochen <i>post operationem</i>
12 Wochen <i>post operationem</i>	Mediales Areal des IS mit diffusem, ausstrahlenden röntgendichten Saum (ca. 0,1 bis 0,2 cm), nicht bis nach dorsal reichend IS zentral weniger röntgendicht	Oberfläche dorsal dezent eingezogen Lateraler Rand des IS mit dezentem, kurzen röntgendichten Saum (Länge 0,4 cm)
18 Wochen <i>post operationem</i>	Medialer, röntgendichter Saum unverändert zu 12 Wochen <i>post operationem</i> <i>IS zentral Zunahme der RÖ-Dichte nach dorsal verzeichnet</i> <i>Planes Erscheinen der Oberfläche</i>	Röntgendichter Saum nicht mehr ansprechbar
24 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 18 Wochen <i>post operationem</i>	Röntgendichter Saum nicht mehr ansprechbar Homogen röntgendichteres Erscheinungsbild des IS
29 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 24 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 24 Wochen <i>post operationem</i>

TC: Tuber coxae, IS: Implantationssitus, RÖ-Dichte: Röntgendichte

Die folgenden Röntgenaufnahmen (siehe Abbildung 114) wurden postoperativ nach 0, 4, 8, 12, 18, 24 und 29 Wochen vom linken Tuber coxae angefertigt. Die Bilder zeigen den Heilungsverlauf des zellbesiedelten Polyurethanschaums, eine nähere

Beschreibung zu den einzelnen Röntgenbildern ist Tabelle 41 zu entnehmen.

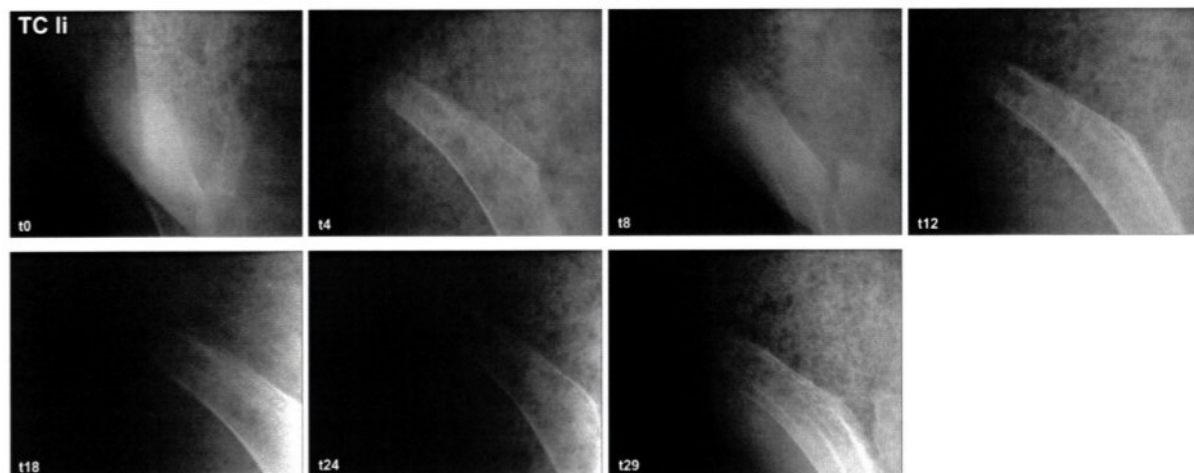


Abbildung 114: Röntgenologische Befunde Tier 91702 des linken Tuber coxae (TC li) über den Zeitraum von t0 sowie 4, 8, 12, 18, 24 und 29 postoperative Wochen, [t (Zeit) in Wochen] (Quelle: Freytox GmbH).

Auch vom rechten Tuber coxae wurden postoperativ nach 0, 4, 8, 12, 18, 24 und 29 Wochen Röntgenaufnahmen angefertigt. Die Röntgenbilder (siehe Abbildung 115) zeigen den Heilungsverlauf des unbesiedelten Polyurethanschaums, eine nähere Beschreibung der einzelnen Röntgenbildern kann Tabelle 41 entnommen werden.

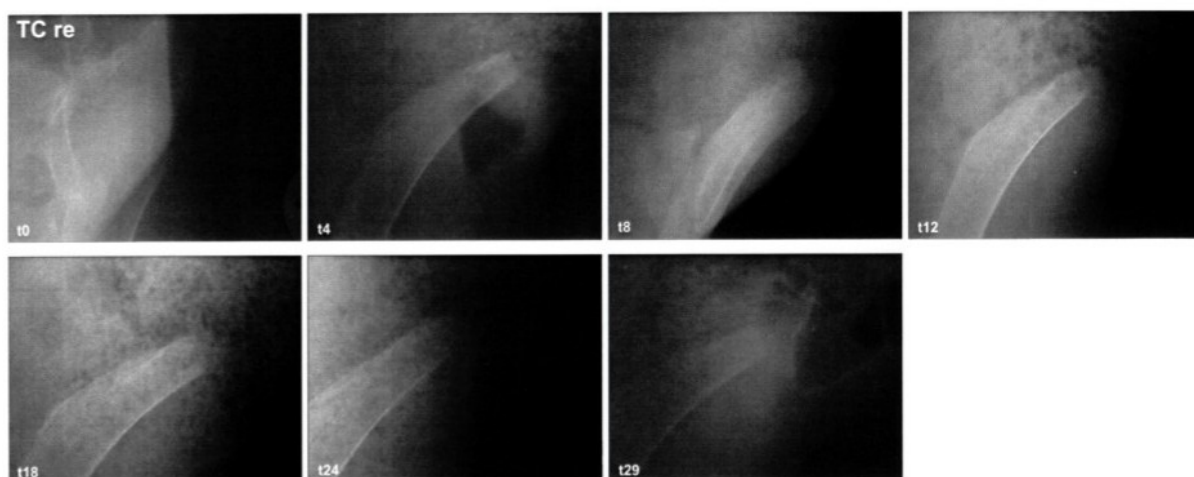


Abbildung 115: Röntgenologische Befunde Tier 91702 des rechten Tuber coxae (TC re) über den Zeitraum von t0 sowie 4, 8, 12, 18, 24 und 29 postoperative Wochen, [t (Zeit) in Wochen]. (Quelle: Freytox GmbH).

Tier Nr. 91758

Tabelle 42: Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde des Tieres 91758 (nativ bis 39 Wochen *post operationem* (verändert nach Prüfplan Freytox GmbH).

Tier 91758	Linkes Tuber coxae, unbesiedelter Polyurethanschaum	Rechtes Tuber coxae, besiedelter Polyurethanschaum
nativ	Ubiquitäre homogene RÖ-Dichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelzeichnung ansprechbar	Ubiquitäre homogene RÖ-Dichte der Spongiosa Struktur der Spongiosa durch Trabekelzeichnung ansprechbar
4 Wochen <i>post operationem</i>	IS-Breite ca. 0,5 cm, IS sagittale Tiefe ca. 1,1 cm IS mit verminderter RÖ-Dichte im Vergleich zu ventral	IS-Breite ca. 0,5 cm, IS sagittale Tiefe ca. 1,2 cm IS mit kelchförmigen Erscheinungsbild Lateroventrales Areal am IS mit lokalem Bereich vermehrter RÖ-Dichte (ca. 0,2-0,3 cm) Zentraler IS gekennzeichnet durch sehr geringgradige RÖ-Dichte
8 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 4 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 4 Wochen <i>post operationem</i> <i>Projektion sehr schräg</i>
12 Wochen <i>post operationem</i>	Mediales Areal des IS mit linearem röntgendichten Saum (ca. 0,1 cm) IS zentral unverändert zu 4 Wochen p.o.	Ränder des IS sehr glatt Zentraler IS gekennzeichnet durch sehr geringgradige Zunahme der RÖ-Dichte
18 Wochen <i>post operationem</i>	Medialer, röntgendichter Saum unverändert zu 12 Wochen <i>post operationem</i> <i>IS zentral</i> unverändert zu 12 Wochen <i>post operationem</i>	unverändert zu 12 Wochen <i>post operationem</i>
24 Wochen <i>post operationem</i>	röntgendichter Saum unverändert zu 12 Wochen <i>post operationem</i> <i>IS zentral</i> dezente Zunahme der Röntgendichte	Röntgendichter Saum an den Rändern des IS medial und lateral: Zunahme der RÖ-Dichte
29 Wochen <i>post operationem</i>	Analog zu Befunden von 24 Wochen <i>post operationem</i>	Rändern des IS medial und lateral: weitere Zunahme der RÖ-Dichte

Tier 91758	Linkes Tuber coxae, unbesiedelter Polyurethanschaum	Rechtes Tuber coxae, besiedelter Polyurethanschaum
35 Wochen <i>operationem</i> <i>post</i>	IS zentral weitere Zunahme der RÖ-Dichte	Alalog zu den Befunden von 29 Wochen <i>post operationem</i> (Anm. starke Überlagerung von Pansen)
39 Wochen <i>operationem</i> <i>post</i>	Analog zu Befunden von 35 Wochen <i>post operationem</i>	Ränder des IS medial und lateral: weitere Zunahme der RÖ-Dichte, bis nach dorsal umspannend Zentrales Areal des IS weniger röntgendicht erscheinend

TC: Tuber coxae, IS: Implantationssitus, RÖ-Dichte: Röntgendichte; p.o. Post operationem

In Tabelle 42 wird der röntgenologische Heilungsverlauf von Tier Nr. 91758 über den Zeitraum von 39 Wochen dokumentiert. Bei diesem Tier wurde das linke Tuber coxae für die Implantation des unbesiedelten Polyurethanschaums verwendet, im rechten Tuber coxae wurde der zellbesiedelte Schaum implantiert.

In der nachfolgenden Abbildung 116 wird der postoperative Heilungsverlauf anhand der Röntgenbilder nach 0, 4, 8, 12, 18, 24, 35 und 39 Wochen gezeigt. Im linken Tuber coxae wurde der unbesiedelte Polyurethanschaum implantiert.

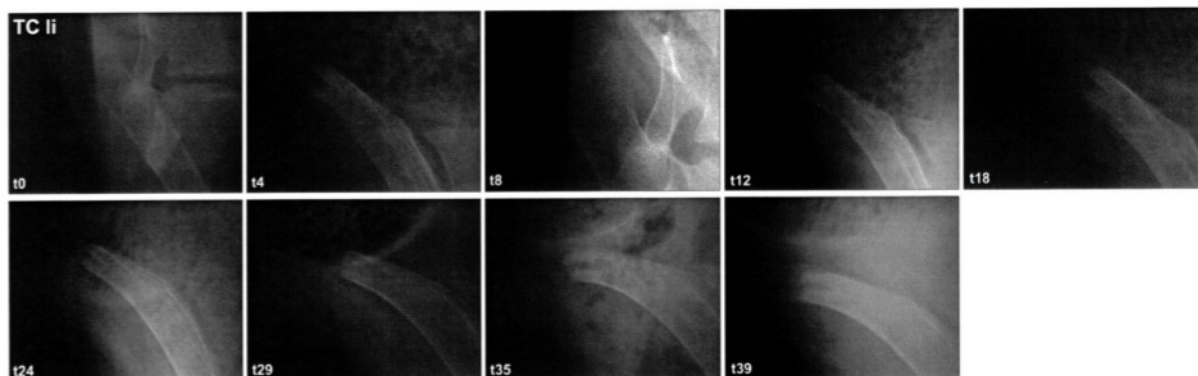


Abbildung 116: Röntgenologische Befunde Tier 91758 des linken Tuber coxae (TC li) über den Zeitraum von t0 sowie 4, 8, 12, 18, 24, 29, 35 und 39 postoperative Wochen, [t (Zeit) in Wochen]. Hier wurde ein unbesiedelter Polyurethanschaum verwendet (Quelle: Freytox GmbH).

In Abbildung 117 werden die entsprechenden Röntgenbilder über den Zeitraum von 39 Wochen von Tier Nr. 91758 mit zellbesiedeltem Polyurethanschaum im Implantationssitus des rechten Tuber coxae gezeigt.

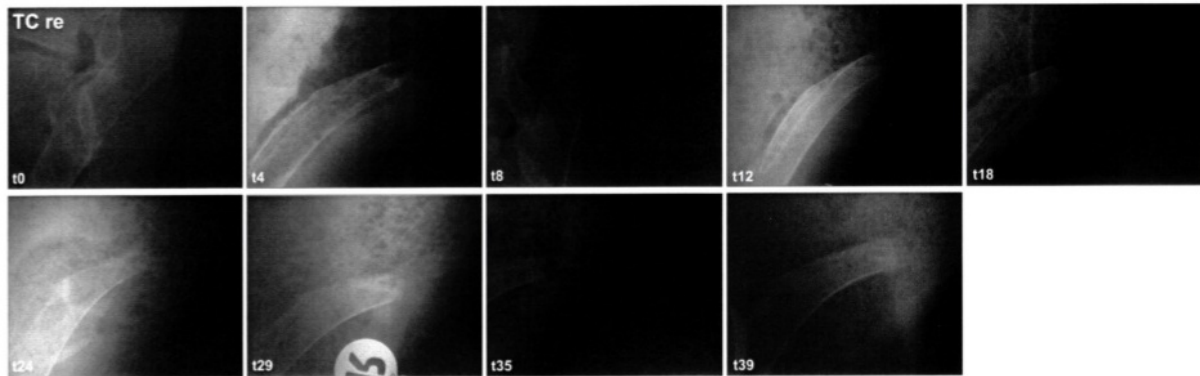


Abbildung 117: Röntgenologische Befunde Tier 91758 des rechten Tuber coxae (TC re) über den Zeitraum von t0 sowie 4, 8, 12, 18, 24, 29, 35 und 39 postoperative Wochen, [t (Zeit) in Wochen]. Hier wurde ein zellbesiedelter Polyurethanschaum verwendet (Quelle: Freytox GmbH).

Die röntgenologisch beobachteten Parameter waren bei den besiedelten Polyurethanschäumen verglichen mit den nicht besiedelten, nativen Schäumen verhältnismäßig höher und stärker ausgeprägt (vgl. Tabelle 43 und Tabelle 44). Die röntgenologischen Veränderungen waren vor allem an den angrenzenden Randgebieten des Implantationssitus feststellbar, wobei sich dort saumartig ein Gebiet mit sich vermehrender Röntgendichte zeigte. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass alle röntgenologischen Veränderungen (bei beide Prüfgegenständen) durchgängig von einer eher dezenten Ausprägung waren (verändert nach dem Prüfplan Fa. Freytox GmbH).

Tabelle 43: Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde für den unbesiedelten Prüfgegenstand 1. (entnommen aus dem Prüfplan Fa. Freytox GmbH).

Unbesiedelter Prüfgegenstand				
Zeitpunkt <i>post operationem</i>	Tier 91709	Tier 91745	Tier 91702	Tier 91758
4 Wochen	IS zentral verminderte RÖ- Dichte	IS zentral verminderte RÖ- Dichte	IS zentral verminderte RÖ- Dichte	IS zentral verminderte RÖ- Dichte
8 Wochen	kVB	IS mit RÖ-dichtem Saum	kVB	kVB
12 Wochen	IS Zunahme RÖ- Dichte	IS RÖ-dichter Saum nicht mehr zu erkennen	IS mit kurzem RÖ- dichtem Saum	IS mit linearem RÖ-dichten Saum
18 Wochen		IS RÖ-dichter Saum nicht mehr zu erkennen IS zentral Zunahme RÖ- Dichte	IS RÖ-dichter Saum nicht mehr zu erkennen	kVB (Saum)
24 Wochen			IS RÖ-dichter Saum nicht mehr zu erkennen IS Zunahme der RÖ-Dichte	kVB (Saum) IS Zunahme der RÖ-Dichte
29 Wochen			kVB	kVb
35 Wochen				kVb (Saum) IS Zunahme der RÖ-Dichte
39 Wochen				kVb

IS: Implantationssitus, kVb: keine Veränderung beobachtet, RÖ: Röntgen

In Tabelle 43 wird abschließend eine Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde des unbesiedelten Polyurethanschaums über den Versuchszeitraum gegeben.

Tabelle 44: Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde für den besiedelten Prüfgegenstand 2. (entnommen aus dem Prüfplan Fa. Freytox GmbH).

Besiedelter Prüfgegenstand				
Zeitpunkt post operationem	Tier 91709	Tier 91745	Tier 91702	Tier 91758
4 Wochen	IS verminderte RÖ-Dichte	IS zentral verminderte RÖ- Dichte	IS zentral verminderte RÖ- Dichte	IS zentral verminderte RÖ- Dichte IS lokaler Saumbereich mit vermehrter RÖ- Dichte
8 Wochen	IS mit RÖ-dichtem Saum	kVB	kVB	kVB
12 Wochen	Saum: Zunahme RÖ-Dichte IS zentral Zunahme RÖ- Dichte	IS mit RÖ-dichtem Saum	IS mit diffusem RÖ-dichtem Saum	IS Ränder glatt IS zentral Zunahme RÖ- Dichte
18 Wochen		Saum: Zunahme der RÖ-Dichte und Ausbreitung (ausstrahlend)	kVb (Saum) IS zentral Zunahme RÖ- Dichte	kVB
24 Wochen			kVb	IS Randbereiche: Zunahme der RÖ- Dichte
29 Wochen			kVb	kVb
35 Wochen				kVb
39 Wochen				IS Randbereiche: Zunahme der RÖ- Dichte

IS: Implantationssitus, kVb: keine Veränderung beobachtet, RÖ: Röntgen

In Tabelle 44 wird analog eine Zusammenfassung der röntgenologischen Befunde der zellbesiedelten Polyurethanschäume über den Versuchszeitraum gezeigt.

1.38.11 Makroskopische Sektionsbefunde

Die folgenden Aufnahmen zeigen die makroskopischen Befunde der einzelnen Versuchstiere nach dem entsprechenden Versuchszeitraum.

1.38.11.1 Referenzgegenstand Osteovit®

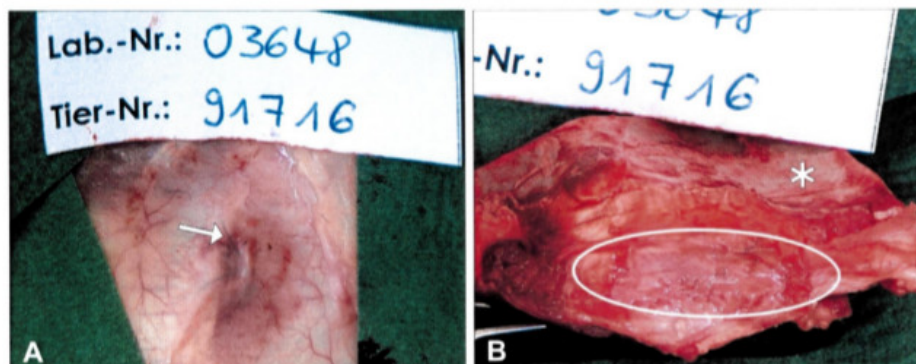


Abbildung 118: Tier 91716, linkes Tuber coxae, Referenzgegenstand. (A): Tuber coxae *in situ*, Fixationsnaht (Pfeil), (B): explantiertes Tuber coxae mit gekennzeichnetem Implantationssitus, Ala ossis ilii ohne besonderen Befund (*) (Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

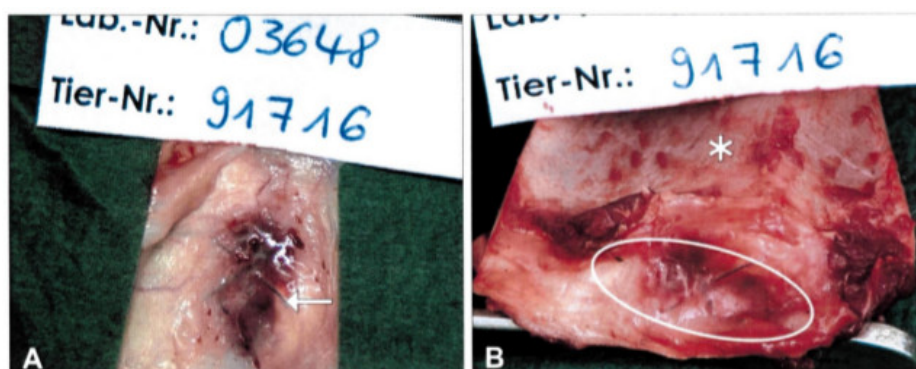


Abbildung 119: Tier 91716, rechtes Tuber coxae, Referenzgegenstand. (A): Tuber coxae *in situ*, Fixationsnaht (Pfeil), (B): explantiertes Tuber coxae mit gekennzeichnetem Implantationssitus, Ala ossis ilii ohne besonderen Befund (*) (Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

Abbildung 118 zeigt das linke Tuber coxae von Tier Nr. 91716, das rechte Tuber coxae wird in Abbildung 119 gezeigt. In Bild A wird jeweils das Implantationsbett *in*

situ gezeigt, während bei Bild B das Tuber coxae explantiert wurde. Auf den Aufnahmen sind die beiden Implantationsbetten des unbesiedelten Referenzgegenstandes Osteovit® nach einem Versuchszeitraum von 12 Wochen gekennzeichnet. Die Fixationsnähte aus Polypropylen sind sichtbar, der Referenzgegenstand Osteovit® selbst hingegen ist im Implantationssitus nicht mehr erkennbar.

1.38.11.2 Prüfgegenstand Polyurethanschaum MSC-besiedelt bzw. unbesiedelt

Abbildung 120 Bild A zeigt das linke Tuber coxae von Tier Nr. 91709 *in situ*, während in Abbildung 120 Bild B, das explantierte Tuber coxae gezeigt wird. Auf den Aufnahmen ist das Implantationsbett des unbesiedelten Polyurethanschaums nach einem Versuchszeitraum von 12 Wochen mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der Polyurethanschaum ist von Gewebe überlagert.

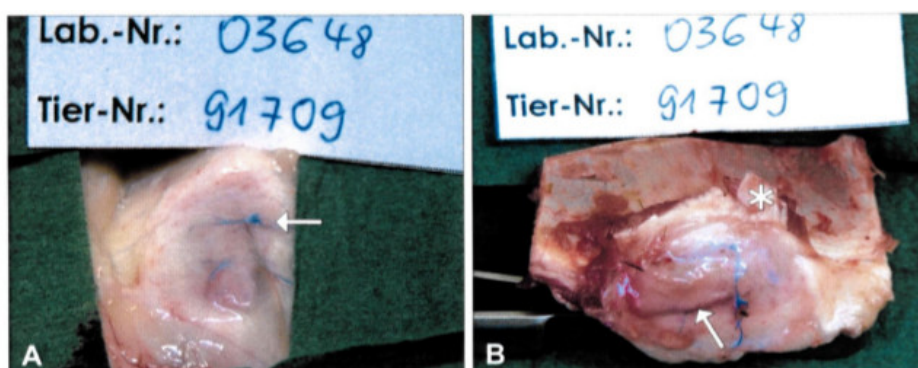


Abbildung 120: Tier 91709, linkes Tuber coxae, unbesiedelter Prüfgegenstand 1. (A): Tuber coxae *in situ*, , Fixationsnaht (Pfeil), (B): explantiertes Tuber coxae, Prüfgegenstand 1 über knöchernen Rand des Implantationssitus ragend (Pfeil), Fixationsnaht (>), Ala ossis ilii ohne besonderen Befund (*) (Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

Abbildung 121 zeigt das Implantationsbett des besiedelten Prüfgegenstandes von Tier Nr. 91709 (Bild A Tuber coxae *in situ*, Bild B: explantiertes Tuber coxae). Auf den Aufnahmen ist das Implantationsbett des besiedelten Polyurethanschaums nach einem Versuchszeitraum von 12 Wochen gekennzeichnet. Der besiedelte Polyurethanschaum steht leicht über den knöchernen Rändern. Der Implantationssitus wird von Bindegewebe überlagert.

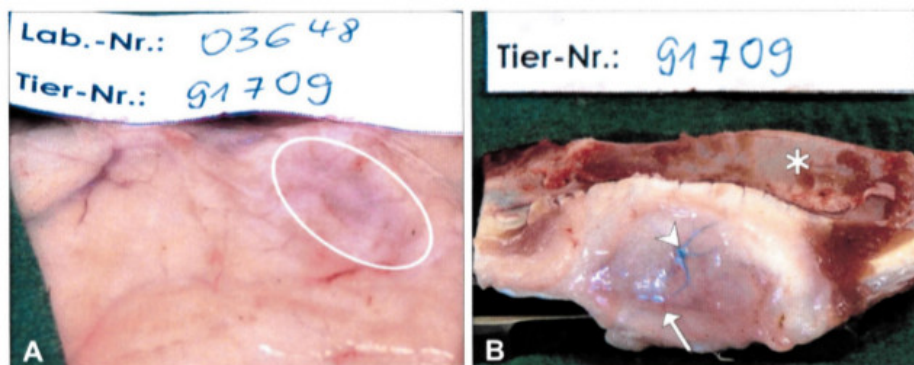


Abbildung 121: Tier 91709, rechtes Tuber coxae, besiedelter Prüfgegenstand 2. (A): Tuber coxae *in situ*, mit gekennzeichnetem Implantationssitus, (B): explantiertes Tuber coxae, Prüfgegenstand 2 über knöchernen Rand des Implantationssitus ragend (Pfeil), Fixationsnaht (>), Ala ossis ilii ohne besonderen Befund (*) (Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

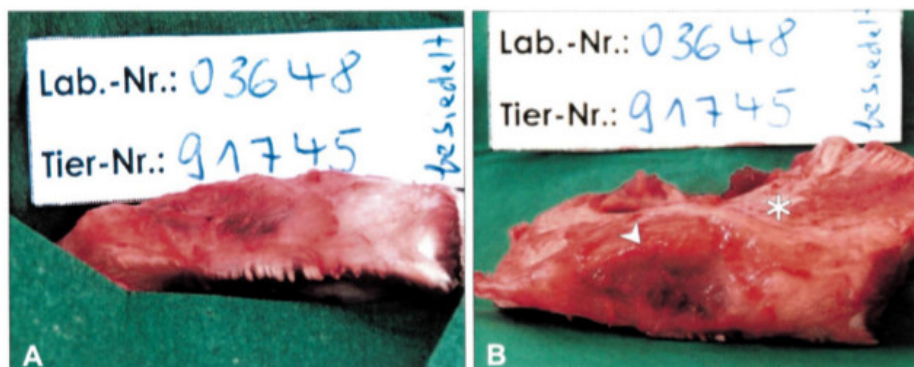


Abbildung 122: Tier 91745, linkes Tuber coxae, besiedelter Prüfgegenstand 2. (A): Tuber coxae *in situ*, (B): explantiertes Tuber coxae, Prüfgegenstand 2 medial über knöchernen Rand des Implantationssitus ragend, Ala ossis ilii ohne besonderen Befund (*) (Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

Die makroskopische Aufnahmen des linken Tuber coxae von Tier Nr. 91745 mit besiedeltem Polyurethanschaum wurden nach dem Versuchszeitraum von 18 Wochen in Abbildung 122 gezeigt (Bild A: *in situ*, Bild B: explantiertes Tuber coxae).

Der besiedelte Schaum ist sichtbar und ragt medial leicht über die knöchernen Ränder heraus (lateral kein Herausragen über knöchernen Rand).

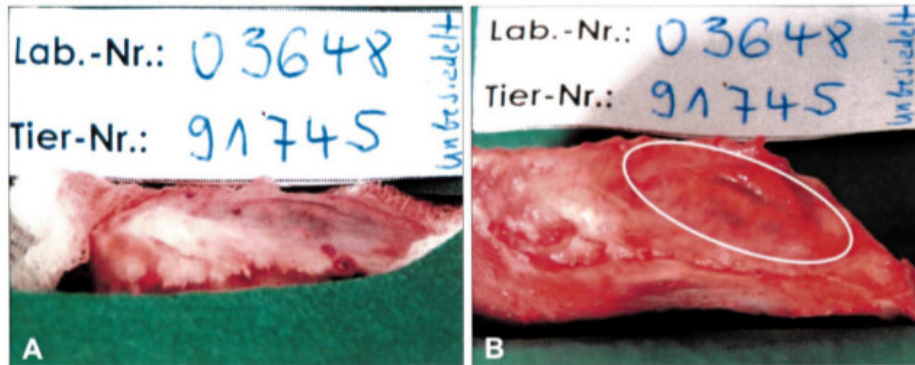


Abbildung 123: Tier 91745, rechtes Tuber coxae, unbesiedelter Prüfgegenstand 1. (A): Tuber coxae *in situ*, (B): explantiertes Tuber coxae, Markierung des Implantationssitus. (Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

Im rechten Tuber coxae von Tier Nr. 91745 wurde der unbesiedelte Prüfgegenstand eingebracht. In Abbildung 123 ist der Implantationssitus gekennzeichnet. Auch hier ist der Polyurethanschaum sichtbar- jedoch nicht über den knöchernen Rand herausragend. Der Implantationssitus ist durch Bindegewebe bedeckt (die Konsistenz ist weich und elastisch).

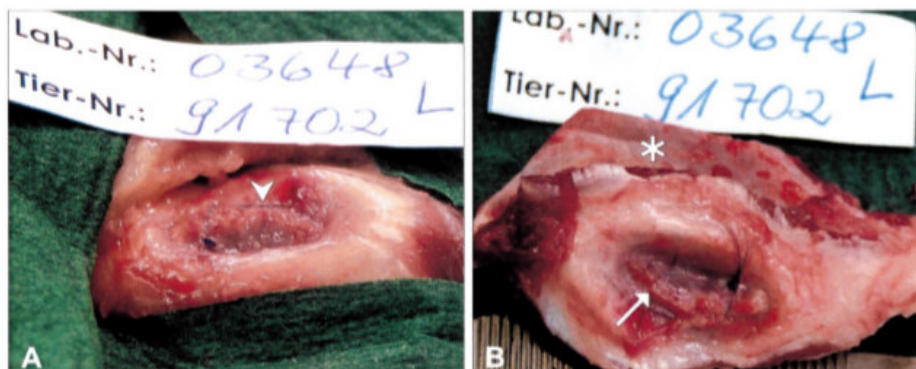


Abbildung 124: Tier 91702, linkes Tuber coxae, besiedelter Prüfgegenstand 2. (A): Tuber coxae *in situ*, Fixationsnaht (>), (B): explantiertes Tuber coxae, Prüfgegenstand 2 zentral im Implantationssitus erhaben (Pfeil), Ala ossis ilii ohne besonderen Befund (*).(Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

Abbildung 124 zeigt das Implantationsbett des besiedelten Prüfgegenstandes des linken Tuber coxae von Tier Nr. 91702 (Bild A Tuber coxae *in situ*, Bild B: explantiertes Tuber coxae). Auf den Aufnahmen ist das Implantationsbett des besiedelten Polyurethanschaums nach einem Versuchszeitraum von 29 Wochen gekennzeichnet. Der Polyurethanschaum ist sichtbar, die Knochenstege überragen jedoch den Schaum. Im zentralen Bereich ist der Polyurethanschaum aber über den Situs erhaben. Der Implantationssitus ist mit Bindegewebe bedeckt (wurde tlw. entfernt).

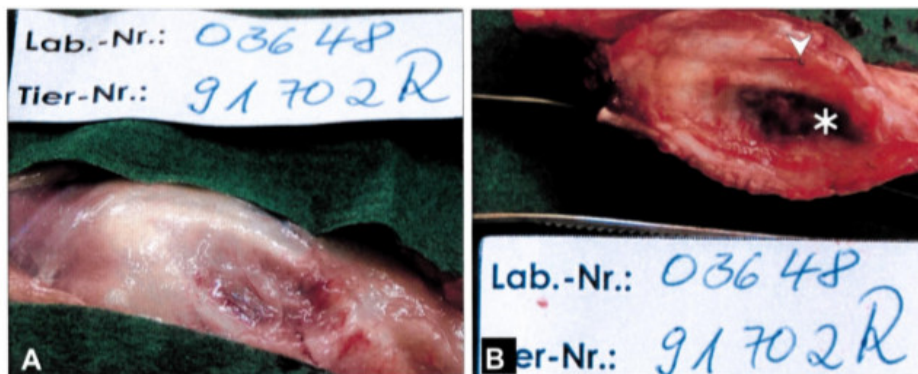


Abbildung 125: Tier 91702, rechtes Tuber coxae, unbesiedelter Prüfgegenstand 1. (A): Tuber coxae *in situ* (B): explantiertes Tuber coxae, Prüfgegenstand zentral von dunkelroter Farbe (*), Fixationsnaht (>).(Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

In Abbildung 125 wird das rechte Tuber coxae (Bild A: *in situ*; Bild B: explantiert) von Versuchstier Nr. 91702 gezeigt. Hier wurde ein unbesiedelter Prüfgegenstand implantiert, dieser ist nach dem Versuchszeitraum noch sichtbar. Knochenstege überragen den Polyurethanschaum. Der Implantationssitus ist mit grauweißem Bindegewebe abgedeckt.

Abbildung 126 Bild A zeigt das linke Tuber coxae von Tier Nr. 91758 *in situ*, während in Abbildung 126 Bild B, das explantierte Tuber coxae gezeigt wird.

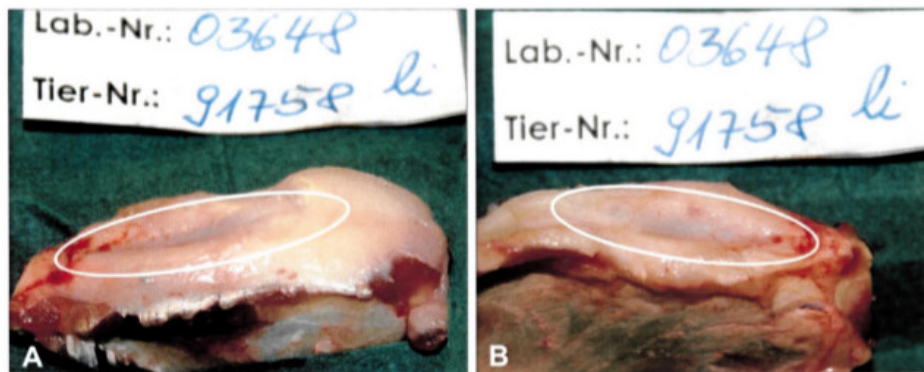


Abbildung 126: Tier 91758, linkes Tuber coxae, unbesiedelter Prüfgegenstand 1. (A): Tuber coxae *in situ*, Markierung des Implantationssitus, (B): explantiertes Tuber coxae, Markierung des Implantationssitus. (Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

Auf den Aufnahmen ist das Implantationsbett des unbesiedelten Polyurethanschaums nach einem Versuchszeitraum von 39 Wochen gekennzeichnet.

In der Umgebung des Implantationssitus befindet sich viel Fettgewebe. Der Polyurethanschaum wird von den Knochenstegen überragt. Der Implantationssitus ist durch straffes Bindegewebe abgedeckt.

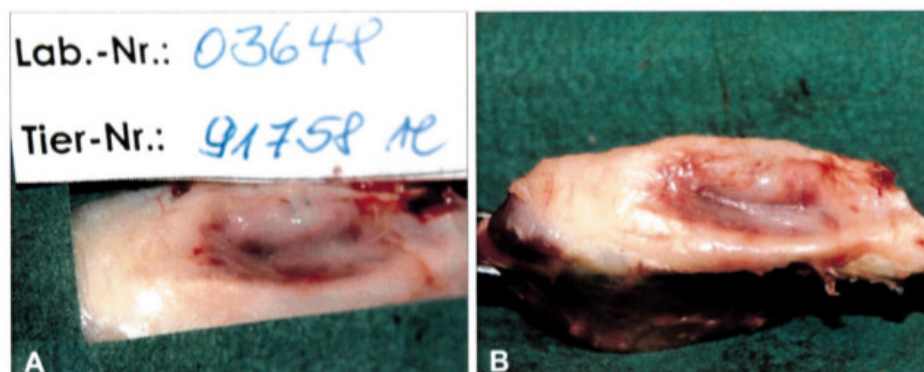


Abbildung 127: Tier 91758, rechtes Tuber coxae, besiedelter Prüfgegenstand 2. (A): Tuber coxae *in situ*, Markierung des Implantationssitus, (B): explantiertes Tuber coxae. (Quelle: Prüfbericht Freytox GmbH).

In Abbildung 127 wird das rechte Tuber coxae von Tier Nr. 91758 gezeigt (Bild A: *in situ*; Bild B: explantiertes Tuber coxae). Hier wurde ein besiedelter Polyurethanschaum implantiert. Auch im Bereich des linken Implantationssitus befindet sich ausgeprägtes Fettgewebe (z.T. entfernt). Der Polyurethanschaum ist nach dem Versuchszeitraum noch erkennbar und deutlich von den Knochenstegen abgrenzbar.

1.38.12 Histologische Befunde

Die histologische Auswertung der explantierten Tuber coxae lag zum Zeitpunkt der Erstellung der Dissertation nicht vor.

1.39 Mikroarray

1.39.1 Übersicht der Alizarinrotquantifizierungen von 20 MSC-Populationen: Auswahl der Spender MSC für das Mikroarray-Experiment

Wie unter 1.31 (Screening nach hMSC-Populationen mit besonders hohem osteogenem Potential) beschrieben, wurde für den Mikroarray nach mesenchymalen Stammzellpopulationen gescreent, die *in vitro* ein besonders hohes osteogenes Potential aufweisen. In Abbildung 128 werden die Ergebnisse des Quantifizierungsversuchs (gemessenen OD-Werte) graphisch dargestellt. Innerhalb der MSC-Populationen variierte die Menge an gemessenem Alizarinrotfarbstoff stark

d.h. das Potential osteogen zu differenzieren ist stark spenderabhängig. Innerhalb derselben Population konnten aber jeweils nur geringe Schwankungen gemessen werden (biologische 4- 6 fach Werte).

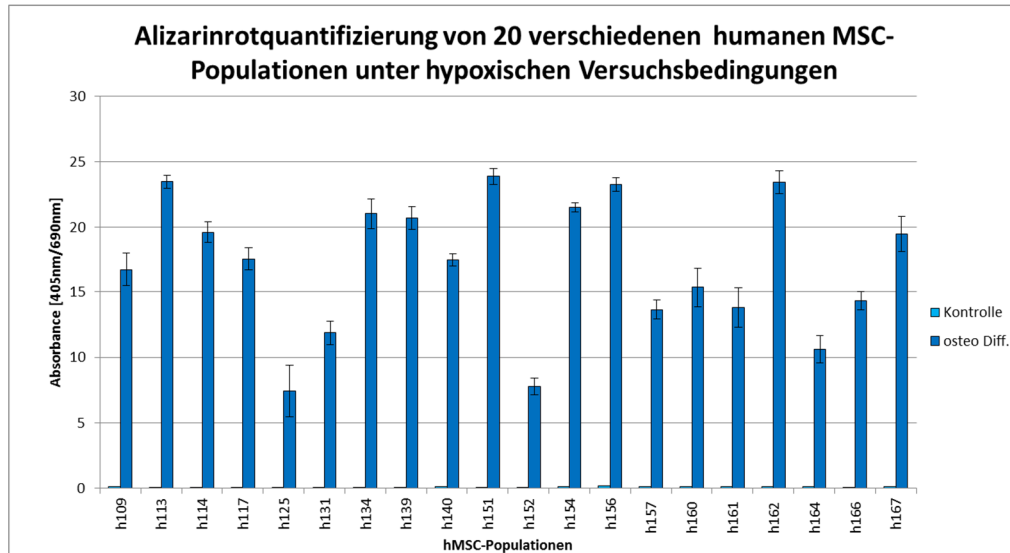


Abbildung 128: Übersicht der gemessenen OD-Werte verschiedener humaner MSC-Populationen bei der Alizarinrotquantifizierung (n=4-6).

Von den untersuchten Populationen zeigten einige Populationen ein überdurchschnittlich gutes osteogenes Differenzierungspotential ($OD > 20$). Die undifferenzierten Negativkontrollen zeigten hingegen keine Matrixbildung ($OD < 0,3$).

Drei Spender wiesen einen besonders niedrigen Anteil an Alizarinrotfarbstoff auf d.h. nur eine sehr schwache osteogene Differenzierung (Spender 125, 152 und 164).

Unter den am stärksten osteogen differenzierenden Populationen waren Spender 113, 134, 139, 151, 154, 156 und 162. Von diesen Populationen wurden 5 ausgewählt (auch nach den Kriterien: Geschlecht und Altersverteilung). In Tabelle 45 werden die 5 Populationen vorgestellt, die *in vitro* am besten osteogen differenzierten und die beiden Kriterien Geschlecht und Alter einschließen. Diese Populationen wurden für das Mikroarray-Experiment eingesetzt.

Tabelle 45: Übersicht der MSC-Spender für das Mikroarray-Experiment.

Population	h113	h134	h151	h156	h162
Alter Patient	50	40	64	59	69
Geschlecht	weiblich	weiblich	männlich	männlich	weiblich
Alizarinrotquantifizierung Undifferenzierte Kontrolle (OD-Werte)	0,077	0,083	0,071	0,169	0,096
Alizarinrotquantifizierung Osteogen differenzierte Zellen (OD-Werte)	23,48	21,04	23,883	23,27	23,42

Die 5 Populationen wurden sowohl in der 2 dimensional (Kulturflaschen) wie auch in der dreidimensionalen Kultur (PU-Scaffolds) getestet. Des weiteren wurde unterschieden zwischen undifferenzierten Zellen (Kulturmedium) und osteogen differenzierten Zellen (osteogenes Medium). Tabelle 46 gibt eine Übersicht der gesamten Mikroarray-Proben.

Tabelle 46: Übersicht der cRNA Ausbeute und der Cy3-Inkorporationsrate.

Probe	Cy3 [pmol/μl]	cRNA [ng/μl]	Volumen [μl]	Einbau-Rate [fmol/ng]
<i>2D_undifferenzierter MSC- Spender 113</i>	1,7	130,9	27	13
<i>2D_undifferenzierter MSC- Spender 134</i>	2,7	171,8	27	16
<i>2D_undifferenzierter MSC- Spender 151</i>	2,3	158,1	27	14
<i>2D_undifferenzierter MSC- Spender 156</i>	1,8	135,6	27	13
<i>2D_undifferenzierter MSC- Spender 162</i>	1,8	140,2	27	13
<i>2D_osteogen differenzierter MSC- Spender 113</i>	2,5	138,3	27	18
<i>2D_osteogen differenzierter MSC- Spender 134</i>	1,8	102,5	27	18
<i>2D_osteogen differenzierter MSC- Spender 151</i>	2,4	149,7	27	16
<i>2D_osteogen differenzierter MSC- Spender 156</i>	2,0	121,3	27	17
<i>2D_osteogen differenzierter MSC- Spender 162</i>	1,8	115,5	27	16
<i>3D_undifferenzierter MSC- Spender 113</i>	1,5	138,5	27	11
<i>3D_undifferenzierter MSC- Spender 134</i>	2,1	146,5	27	14
<i>3D_undifferenzierter MSC- Spender 151</i>	1,9	161,7	27	12
<i>3D_undifferenzierter MSC- Spender 156</i>	1,9	153,5	27	12
<i>3D_undifferenzierter MSC- Spender 162</i>	1,8	157,1	27	12
<i>3D_osteogen differenzierter MSC- Spender 113</i>	1,6	134,8	27	12
<i>3D_osteogen differenzierter MSC- Spender 134</i>	1,7	145,7	27	12
<i>3D_osteogen differenzierter MSC- Spender 151</i>	1,7	153,1	27	11
<i>3D_osteogen differenzierter MSC- Spender 156</i>	1,9	165,7	27	11
<i>3D_osteogen differenzierter MSC- Spender 162</i>	2,1	165,2	27	13

Nach der Extraktion der RNA mittels Trizol wurden die 20 RNA- Proben auf ihre Reinheit (RIN-Werte zwischen 8 und 9,4) und Menge überprüft. Nachdem die eingereichten Proben eine gute RNA-Qualität aufwiesen, erfolgte die Amplifikation und der Einbau des Cy3-Farbstoffs in die RNA-Proben (Fa. Miltenyi Biotec). Die

RNA-Ausbeute und die Rate des Farbstoff-Einbaus wurden durch das ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies) gemessen (siehe Tabelle 46).

Nach dem Einbau des Farbstoffs Cy3 erfolgte die Hybridisierung der Einzelproben nach dem Protokoll der Fa. Miltenyi Biotec. Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Arrayproben wurden durch das Agilent Microarray Scanner System detektiert. Die Auswertung der Signale wurde mit Hilfe der Agilent Feature Extraktions Software vorgenommen. Diese Software ermöglicht die Bestimmung der Intensität der Probe (einschließlich der Subtraktion des Probenhintergrunds), verwirft Ausreißer und berechnet die statistischen Wahrscheinlichkeiten. Für die Bestimmung der unterschiedlich exprimierten Gene, wurden die Daten durch eine weitere Software analysiert (Rosetta Resolver® Gen Expression Data Analysis System). Die Ergebnisse des Experiments werden durch ein doppelt logarithmischen Plot visualisiert.

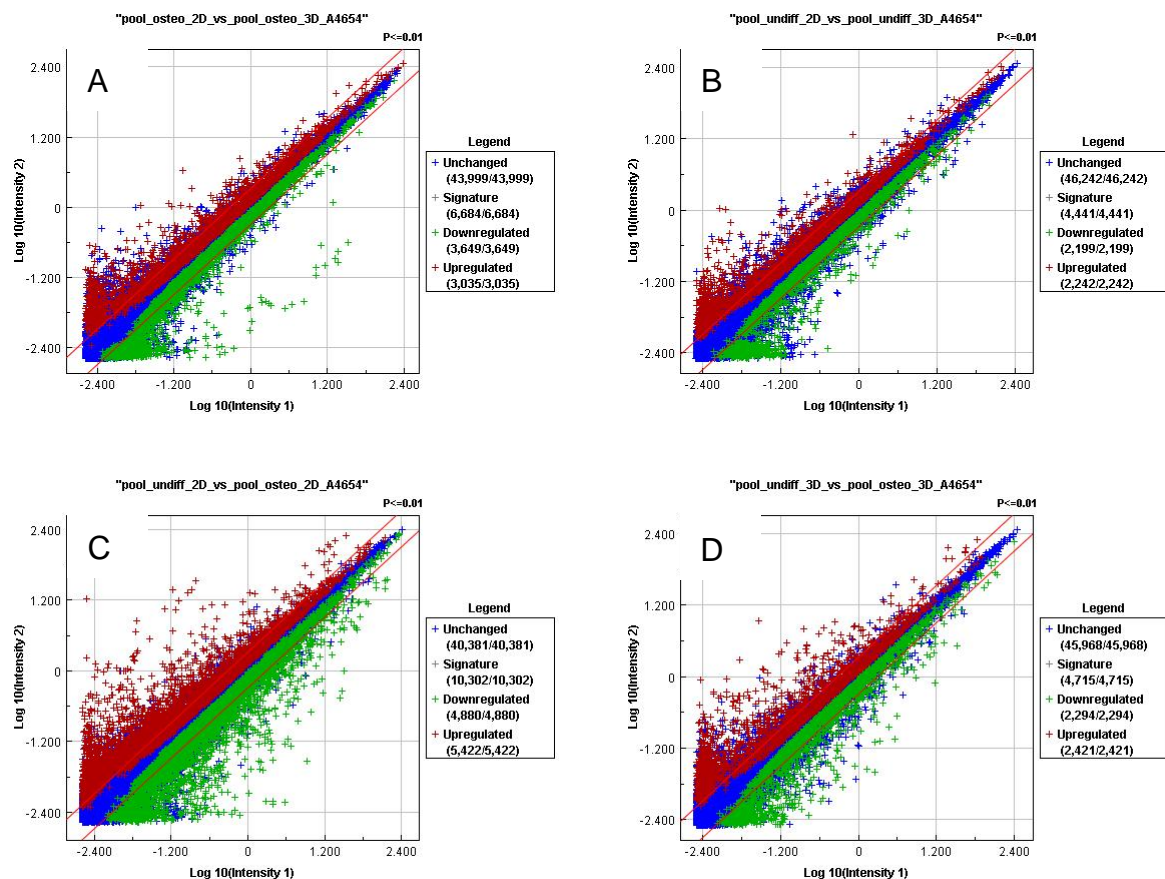


Abbildung 129: Streudiagramm-Darstellung der Signalintensitäten aller Analysen. A: Vergleich der osteogen differenzierten Proben in der 2 dimensionalen Kultur gegenüber den osteogen differenzierten Proben in der 3D-Kultur. B: Übersicht der undifferenzierten Zellen in der 2D-Kultur gegenüber den undifferenzierten Zellen in der 3D-Kultur. C: Vergleich der undifferenzierten Zellen gegenüber den osteogen differenzierten Zellen in der 2D-Kultur. D: Vergleich der undifferenzierten Zellen gegenüber den osteogen differenzierten Zellen in der 3D-Kultur.

In Abbildung 129 wurden die Signalintensitäten aller Analysen als Streudiagramme dargestellt. Hier wurden die gepoolten Ergebnisse aller getesteten hMSC-Populationen gezeigt. Die Signalintensitäten jeder Analyse wurde durch einen Punkt repräsentiert. Auf der x-Achse sind die Signalintensitäten der Kontrollen logarithmisch aufgetragen; auf der y-Achse die Signalintensitäten der Proben. Die roten diagonalen Linien definieren die Gebiete der 2-fachen Änderung der Signalintensitäten. Blaue Kreuze zeigen Gene an, deren Expression unverändert

bleibt, rote Kreuze zeigen signifikant hochregulierte Gene ($p\text{-Wert} < 0,01$) und grüne Kreuze veranschaulichen die signifikant herunterregulierten Gene ($p\text{-Wert} < 0,01$).

Die Streuung der hoch- bzw. herunterregulierten Gene war in den beiden Streudiagrammen C und D, welche jeweils die Kontrollzellen vs. die osteogen differenzierten Zellen vergleichen weitaus höher wie in den beiden Diagrammen A und B, wo lediglich zwischen 2 und 3-dimensionaler Kultur innerhalb der osteogenen Gruppe bzw. der undifferenzierten Gruppe untersucht wurde. In den Legenden wurde bei jedem Streudiagramm dargestellt, wieviele Gene hoch bzw. herunterreguliert wurden (in Klammern Absolutzahlen). Die grauen Kreuze in den Legenden geben die Summe der hoch- und herunterregulierten Gene an. So wurden etwa beim Vergleich der osteogen differenzierten Zellen in der 2 D-Kultur vs. 3 D-Kultur insgesamt 6684 Gene verändert exprimiert (3035 wurden hochreguliert, 3649 Gene wurden herunterreguliert). Betrachtet man dagegen die undifferenzierten Zellen gegenüber den osteogen differenzierten Zellen (beide in 2-D Kultur) in Streudiagramm C waren insgesamt 10 302 Gene verändert exprimiert (5422 wurden hochreguliert, 4880 herunterreguliert). Die Daten des Array-Experiments wurden in Genlisten zusammengefasst (normalisierte Proben/Kontrollen- \log_{10} Ratio und -fache Änderungen, Sequenz Beschreibungen, p-werte). Mögliche Kandidatengene mit einer >2-fachen Änderung der Genexpression und p-Werten $< 0,01$ wurden zusammengefasst in einer Vorauswahl an Kandidatengenen.

Ziel der Array-Analyse sollte die Identifizierung von Genen sein, die unterschiedlich exprimiert wurden zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen (2D-vs 3D-Kultur bzw. undifferenzierte vs. osteogen differenzierte Zellen). Um eine nähere Einschätzung der biologischen Funktion dieser Kandidatengene zu erhalten bzw. in welchen biologischen Signalwegen sie eine Rolle spielen, sollte durch die

Bioinformatik-Abteilung (Fa. Miltenyi) eine Korrelationsanalyse bzw. eine funktionelle Gruppenanalyse erstellt werden.

1.39.2 Funktionelle Gruppenanalyse

Die funktionelle Gruppenanalyse gibt einen Überblick über die verschiedenen biologischen Prozesse und Signalwege, die mit den identifizierten Kandidatengenen in Verbindung gebracht werden. Die identifizierten Kandidatengene wurden hier biologischen Prozessen oder Funktionen zugeordnet (migo_bp) bzw. biologischen Signalwegen (migo_pathways). Im weiteren wurde dann geprüft ob die jeweiligen hoch bzw. herunterregulierten Gene für Mitglieder oder aber Ziele eines Signalwegs kodierten.

Ergebnisse des Vergleichs 2D- vs. 3D-Kultur

Gene, die in der osteogenen 3 D-Kultur signifikant höher exprimiert wurden wie in der 2-D-Kultur gehörten v. a. den folgenden Kategorien an: extrazelluläre Matrix (39), Zellmigration (49), Entwicklung (138), Lipidstoffwechsel (49), Antwort auf Toxine (102) oder oxidativen Stress (24), Zelldifferenzierung (99), Zelladhäsion (44), Zellproliferation (58), Rezeptor- Signalübertragung (121) aber auch Inflammation (22) und Angiogenese (24). Die hochexprimierten Gene konnten keinem biologischen Signalweg (Migo Pathway) zugeordnet werden. Die Gene, mit hochregulierter Expression codierten auch nicht für Mitglieder eines Signalwegs. Es konnten jedoch einige Gene identifiziert werden, die als Ziele (Targets) eines Signalwegs von Bedeutung sind dazu gehören Gene, die durch den TGF-beta Rezeptor Signalweg

(17), den FSH (13), TSH (5), IL1-Signalweg (7) oder den EGF-Rezeptor Signalweg (8) induziert werden. Desweiteren existieren Gene deren Transkription signifikant unterdrückt wurde durch den IL-1 Signalweg (5), EGF-Rezeptor Signalweg (5) oder den IL-2 Signalweg. Es konnten keine Gene identifiziert werden, die signifikant niedriger in der osteogenen 3-D-Kultur im Vergleich zur osteogenen 2-D-Kultur exprimiert wurden.

Bei Betrachtung des undifferenzierten 2D- vs. 3D-Ansatzes zeigte sich, dass insgesamt nur sehr wenige Gene hoch- bzw. herunterreguliert wurden. Diese Gene wurden in folgenden biologischen Signalwegen in der undifferenzierten 3 D-Kultur signifikant niedriger exprimiert wie in der undifferenzierten 2 dimensional Kultur: FGF (9) und NGF (12). 15 Gene, deren Expression durch den TGF-beta Signalweg induziert wurde, wurden in der 3D-Kultur signifikant niedriger exprimiert wie im entsprechenden 2D-Ansatz. Es gibt aber auch Gene, deren Expression durch den IL1-Signalweg (12), den EGF-Rezeptor Signalweg (10) oder den IL-5 Signalweg (11) induziert wurde, die bei den undifferenzierten Zellen in der 3 dimensional Kultur signifikant höher exprimiert wurden wie bei den undifferenzierten Zellen in der 2 D-Kultur. Generell gibt es im Vergleich der undifferenzierten Zellen in der 2D-Kultur vs. 3 D-Kultur nur sehr wenige Gene die signifikant unterschiedlich exprimiert wurden. Im Gegensatz hierzu unterschied sich die Genexpression in der 2D-Kultur vs. 3 D-Kultur bei den osteogen differenzierten Zellen doch deutlich in der Anzahl an unterschiedlich exprimierten Genen welche v.a. bei der Differenzierung, Rezeptorsignalwegen und in der Entwicklung eine wichtige Rolle spielten.

Ergebnisse des Vergleichs undifferenzierte- vs. osteogen differenzierten Zellen

Gene, die bei undifferenzierten Zellen signifikant höher exprimiert wurden wie in osteogen differenzierten Zellen, gehörten sowohl in der 2 dimensional Kultur wie auch in der 3-D-Kultur zu folgenden Kategorien: Extrazelluläre Matrix, Zelladhäsion, Entwicklung, Angiogenese, Zellmigration und Zelldifferenzierung. In beiden Kulturvarianten (2 und 3D-Kultur) waren die Gene, die zum TGF-beta Signalweg gehörten signifikant höher bei den undifferenzierten Zellen gegenüber den osteogen differenzierten Zellen exprimiert. Innerhalb der 2 D-Kultur waren weitere Gene bei den undifferenzierten Zellen geg. den osteogen differenzierten Zellen höher exprimiert, diese waren an den beiden Signalwegen BMP und Wnt beteiligt.

Es liesen sich innerhalb der 2 dimensional Kultur Gene identifizieren, deren Expression durch den TGF-beta Rezeptor Signalweg (44) induziert wurden oder die durch den FSH (21) bzw. den IL-2 Signalweg (39) herunterreguliert wurden, die bei den undifferenzierten Zellen signifikant höher exprimiert wurden wie bei den osteogen differenzierten Zellen. Dagegen exprimierten die osteogen differenzierten Zellen Gentranskripte des Death Rezeptor-Signalwegs signifikant höher (26). Innerhalb der 3 dimensional Kultur wurden mehrere Gene bei den undifferenzierten Zellen höher exprimiert im Vergleich zu den osteogen differenzierten Zellen. Hierbei handelte es sich um Gene, die durch den TGF-beta Rezeptorsignalweg (26), den IL-4 Signalweg (18), den Leptin-Weg (5), den TNFalpha-Signalweg (10) oder den Wnt-Signalweg (4) induziert wurden oder um Gene die durch die beiden Signalwege FSH (5) und TGF-beta Rezeptor-Signalweg (21) unterdrückt wurden.

Es gab eine Vielzahl an Genen, die bei den osteogen differenzierten Zellen signifikant höher exprimiert wurden wie bei den undifferenzierten Kontrollen. Diese Gene konnten in folgende Kategorien eingeteilt werden: Antwort auf Toxine (147), Zellzyklus (86), Zytoskelett (120), Zelldifferenzierung (139), Proliferation (88), Zellmigration (58), Entwicklung (175), Angiogenese (37), Rezeptor Signaling (150) und weitere. Es liessen sich innerhalb der 3 D-Kultur Gene identifizieren, deren Expression durch den EGF-Rezeptor Signalweg (19), den IL-4 Signalweg (18), den Notch-Signalweg (4) oder den IL-5 Signalweg (11) induziert wurden oder die durch den IL-2 (39) bzw. den TGF-beta Signalweg (40) herunterreguliert wurden, die bei den osteogen differenzierten Zellen signifikant höher exprimiert wurden wie bei der undifferenzierten Kontrolle.

Diskussion

Die Untersuchungen zur Qualität der osteogenen Differenzierungskapazität von MSC und der Existenz bestimmter Oberflächenmarker, sog. Pluripotenzmarker, hat gezeigt, dass die Expression der getesteten Oberflächenmarker (W8B2, GD2, CD146 und SSEA-4) nicht wie in der Literatur beschrieben mit einer höheren Differenzierungsfähigkeit z. B. einer besseren osteogenen Potenz der MSC-Populationen korreliert. Beispielsweise wird von einigen Forschergruppen (Aicher et al., 2011; Sorrentino et al., 2008; Ulrich et al., 2015) der Oberflächenmarker CD146 in Zusammenhang mit einem erhöhten osteogenen Potential gebracht. Auch bei anderen Oberflächenmarker wie W8B2 (Boxall & Jones, 2012), SSEA-4 (Boulting et al., 2011a; Gang, Bosnakovski, Figueiredo, Visser, & Perlingeiro, 2007; Guillot et al., 2007) oder GD-2 (Martinez et al., 2007), welche in Zusammenhang mit einer guten Differenzierungsfähigkeit von MSC gebracht werden, konnte keine Korrelation zwischen der Güte der osteogenen Differenzierung der Zellen und der Expression der getesteten Oberflächenmarker gemacht werden (siehe Abbildung 15). Die Verteilung der Oberflächenmarker ist bei den getesteten MSC-Populationen sehr unterschiedlich.

Allgemein kann eine wichtige Aussage über das osteogene Potential der Populationen und dem Wachstumsverhalten *in vitro* gemacht werden. Die hMSC-Populationen, denen ein gutes osteogenes Potential nachgewiesen werden konnten, zeigten alle ein sehr gutes Proliferationsverhalten. Im Umkehrschluss konnte bei den 5 Populationen, welche durch ein niedriges osteogenes Potential auffielen, ein sehr schlechtes Wachstumsverhalten beobachtet werden (Einzelzellen, lösen sich ab, sehr langsames Wachstum). Für künftige potentielle Empfänger spendereigener

MSC sollte als Minimalkriterium ein gutes *in vitro* Wachstumsverhalten der Zellen vorliegen. Auch Baksh et al. konnten beim Vergleich von multipotenten perivaskulären Nabelschnurzellen mit humanen Knochenmark-MSC zeigen, dass die schneller wachsenden Nabelschnurzellen auch schneller osteogen differenzieren können, d.h. ein direkter Zusammenhang zwischen der Differenzierungsfähigkeit und dem Proliferationsverhalten der Zellen besteht (Baksh, Song, & Tuan, 2004). Der Zusammenhang zwischen dem Proliferationsverhalten von Zellen und der Güte der osteogenen Differenzierung konnten auch Di Girolamo et al. zeigen, mit zunehmenden „Alter“ d.h. in hohen Passagen behalten die MSC ihre Fähigkeit osteogen zu differenzieren (im Gegensatz zur adipogenen und chondrogenen Differenzierungsfähigkeit). Je höher aber die Zellpassage ist, desto langsamer proliferieren die Zellen und desto schwächer mineralisieren die Zellen im Vergleich zu jungen, stark wachsenden Passagen (DiGirolamo et al., 1999).

Wie bereits durch andere Forschergruppen gezeigt werden konnte, ist die Verwendung von tierenserumfreien Kulturmedien allgemein für die Kultivierung von humanen MSC geeignet (Bieback et al., 2009). Auch bei den hierzu durchgeführten Experimenten (Kultivierung von drei unterschiedlichen hMSC Populationen in verschiedenen GMP-grade Medien ohne tierische Zusätze) konnte die Eignung bzw. sogar die Überlegenheit tierenserumfreier Medien gegenüber Kulturmedium mit bovinen Zusätzen gezeigt werden. Die Zellen zeigten ein gutes Proliferationsverhalten in den Testmedien mit 5% Thrombozytenlysat-Zusatz sowie mit 10% A- bzw. AB-Serum. Das osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierungspotential der drei getesteten MSC-Populationen waren bei allen Testmedien ähnlich. Der Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an humaner

Albuminlösung verbesserte die Differenzierungsergebnisse der drei Testpopulationen nicht.

Der Z® RP 6000 GMP Breeder (Fa. Zellwerk) eignet sich für eine GMP konforme Expansion von spendereigenen MSC für die potentielle klinische Anwendung (Diederichs et al., 2009; Reichardt et al., 2013; Sittering). So konnten in mehreren Reaktorläufen bis zu 25 Mio MSCs in 8 Tagen expandiert werden. Die Zellen behalten ihr Differenzierungspotential wie entsprechende Differenzierungsexperimente belegen. Das System war zum Zeitpunkt der Testung noch nicht vollständig ausgereift und anfällig für Störungen (Reaktorprototyp). Es zeigte aber ein großes Potential für einen künftigen klinischen Einsatz.

Als Angiogenese wird der Prozess der postnatalen Blutgefäßneubildung bezeichnet. Dies ist ein notwendiger Prozess bei der Heilung von Wunden wie z.B bei der Heilung von Knochendefekten. Allerdings spielt Angiogenese auch eine wesentliche Rolle bei der Vaskularisierung von malignen Tumoren und Metastasen. Ein wichtiger Schritt während der Angiogenese ist die Rekrutierung von endothelialen Zellen, welche durch Migrations- und Proliferationsprozesse neue Gefäße formieren können. Die während der Leukapherese gewonnene mononukleäre Zellfraktion scheint den endothelialen Vorläuferzelltyp ECFC in angereicherter Form zu enthalten (Hernandez et al., 2000; Shepherd et al., 2006). Die ECFC-Zellen zeigen in der Zellkultur eine phänotypisch kuboidale Morphologie mit typischem „kopfsteinpflasterartigen“ Wachstum. Die Zellen weisen außerdem funktionelle Charakteristika wie der Kapillarbildungsfähigkeit *in vitro* auf, die sie von reifen endothelialen Zellen unterscheiden (Hirschi et al., 2008). Ferner unterscheiden sich diese Progenitorzellen durch Oberflächenmarker, welche nicht auf der Oberfläche von

reifen Endothelzellen vorkommen. Der Vorläufercharakter der isolierten Leukapherese-Zellen wird durch die angefertigten FACS-Daten bestätigt- alle untersuchten konstitutiven Endothelzellmarker (CD 31, CD105, CD29, CD44, CD146 und VEGF-R2) sind in allen Leukapherese-Isolaten gleichermaßen nachweisbar. Die bei reiferen Endothelzellen exprimierten Oberflächenmarker CD14 und CD45 konnten bei den Leukapherese-Isolaten nicht nachgewiesen werden (<2,1%). Zudem wird der Oberflächenmarker CD144 bei reifen Endothelzellen nur sehr schwach exprimiert, hier konnte bei allen isolierten Zellpopulationen eine sehr starke Expression (>94,9%) beobachtet werden. Bei den isolierten Primärzellen aus den Leukapheresen handelt es sich nach Abschluss aller Charakterisierungsexperimente zum *in vitro* Kapillarbildungspotential, der Dil-Ac-LDL-Aufnahme und der Untersuchung der Oberflächenmarker um den Progenitorzelltyp „ECFC“ (Endothel-Kolonie-bildende Zellen) und nicht um den reiferen, ausdifferenzierteren Zelltyp „CFU-EC oder CFU-Hill“. Obwohl auch reifere Endothelzellen an Angiogenese-Vorgängen beteiligt sind, besitzt nur der Progenitorzelltyp ECFC die Eigenschaft der Ausbildung neuer Gefäße *in vivo* (Critser & Yoder, 2010). Die Isolierung der ECFC über die Leukapherese ist relativ einfach und – abzüglich dem Legen eines Zugangsschmerzlos für den Spender. So könnte in Kombination mit der Gabe spendereigener MSC eine synergistischer Effekt auf die Heilung von (Knochen-)defekten erzielt werden (Aguirre et al., 2010; Seebach et al., 2010). Hier können auch weitere Gebiete der regenerativen Medizin eingeschlossen werden, wo diese vielversprechende Zellkombination positive Erfolge erzielen könnte (Au et al., 2008).

In den vergangenen 25 Jahren gab es zahlreiche Bemühungen von verschiedenen Forschergruppen ein geeignetes synthetisches Knochenersatzmaterial zu finden. Allein in den letzten zehn Jahren gab es über 12 000 Einträge in der PubMed-

Datenbank über das Tissue Engineering von Knochen sowie weitere 2 000 Veröffentlichungen über Knochenersatzmaterialien (Hollister & Murphy, 2011).

Für den Einsatz als Knochenersatzmaterial gibt es bereits einige Gel-basierte Materialien, welche als Knochenersatz experimentell untersucht wurden, z.B. Hyaluron-, Polyethylenglykol- oder Alginatgele. Im Gegensatz zu den hier beschriebenen *in vitro* Versuchsergebnissen des Nanogels® konnte beim Hyalurongel (zumindest in Kombination mit dem Wachstumsfaktor BMP) eine gute Knochenheilung nachgewiesen werden (Dreifke, Ebraheim, & Jayasuriya, 2013).

Es gibt eine Definition für “Biokompatibilität” der European Society for Biomaterials (1986): „The ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application“. Hier muss aber die jeweilige spezifische Anwendung betrachtet werden. Ein Material kann aufgrund seiner biologischen und chemischen Eigenschaften für eine bestimmten Gebrauch geeignet sein, für einen andere Anwendung jedoch nicht. Der Polyurethan-Schaum besitzt beispielsweise ideale Voraussetzungen für eine elastische Anwendung im Bereich des Knorpelersatz (Meniskusersatz, Actifit®) – das Material ist jedoch gemäß unseren tierexperimentellen Ergebnissen gänzlich ungeeignet für den Einsatz als Knochenersatzmaterial. Als weiteres Beispiel für die Biokompatibilität in Zusammenhang mit der spezifischen Anwendung kann das hier getestete Nanogel® angeführt werden. Nanogel® besteht aus dem Material Kalziumphosphat, welches sich seit vielen Jahren als Knochenersatz bewährt hat. Jedoch zeigt das Material sehr toxische Effekte in nanopartikulärer Form. Die Geometrie des Stoffes spielt dementsprechend auch eine sehr große Rolle für die Eignung eines Stoffes als Biomaterial. Für potentielle Implantate (hier: Knochenersatzmaterialien) kann unter Biokompatibilität nochmals weiter differenziert werden zwischen

Strukturkompatibilität (insbesondere gute mechanische Eigenschaften) und Oberflächenkompatibilität (insbesondere die Wechselwirkung mit dem umgebenden Gewebe) (Wintermantel E., 2002). Während das Nanogel®-Material eine gute Strukturkompatibilität aufweist (wie auch andere Kalziumphosphat- Implantate) schneidet es bei der Oberflächenkompatibilität sehr schlecht ab (im Gegensatz zu anderen Kalziumphosphatmaterialien). Der Kontakt zwischen dem Knochenersatzmaterial und dem Körpergewebe erfolgt an der Grenzfläche. Daraus folgt, dass die Natur der Grenzfläche (lokale Ionenkonzentration, lokaler pH-Wert, Oberflächenmorphologie, Zelladsorption und Proteinadsorption) entscheidend ist für die biologische Kompatibilität (Wintermantel E., 2002). Bei dem untersuchten Nanogel®Material kann nicht, wie bei anderen Knochenersatzmaterialien, eine solche Wechselwirkung an der Grenzfläche beobachtet werden, stattdessen untermauern die Transmissionselektronenmikroskopischen-Aufnahmen die Hypothese, dass es zur Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen kommt. So existiert in diesem Fall keine konkrete Oberflächenkompatibilität sondern die Zelle wird mit den Nanopartikeln im Zellinneren (Organellen) konfrontiert. In diesem Fall sehen sich die Zellen nicht den Implantat-typischen Wechselwirkungen zwischen äußerer Zellmembran und Implantat ausgesetzt, sondern durch die Aufnahme der Partikel kommt es zu Wechselwirkungen mit intrazellulären Organellen, Proteinen etc.

Verschiedene Forschergruppen haben in den letzten Jahren gezeigt, dass für die Transfektion von Zellen nicht nur Kalziumphosphat-Moleküle dienen können (mittels Standard-Kalziumphosphatpräzipitatemethode) sondern dass auch Kalziumphosphat-Nanopartikel an DNA-Moleküle binden und diese Kalziumphosphat-DNA-Nanopartikel-Aggregate dann erfolgreich in die Zellen geschleust werden. Chowdhury et al. synthetisierten Kalziumphosphat-DNA-Nanopartikel, welche eine

10-fach höhere Transfektionseffizienz aufwiesen wie die Standard-Kalziumphosphatmethode (Chowdhury et al., 2004). Ein entscheidendes Parameter für die Transfektion von Zellen ist die Größe der eingesetzten Kalziumphosphat-Nanopartikel, welche für die Transfektion eingesetzt werden. Bisht et al. verwendeten in ihren Experimenten Kalziumphosphat-Nanopartikel mit einer Größe von 100- 120 nm, die *in vitro* eine höhere Transfektionseffizienz aufwiesen wie das Transfektionsagenz Polyfect® (Bisht, Bhakta, Mitra, & Maitra, 2005). Die Größe dieser Kalziumphosphat-Partikel ist vergleichbar mit der Nanopartikelgröße des Teknimed-Produkts Nanogel®. Laut Hersteller liegt hier die mittlere Größe der Partikel zwischen 100 und 200 nm. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen die Inkorporation der Kalziumphosphatnanopartikel in die Zellen. Humane Stammzellen, welche mit Nanogel®-behandelt wurden, zeigten intrazelluläre Einschlüsse an Nanopartikeln (siehe 1.37.2 TEM-Aufnahmen) im Gegensatz zu unbehandelten Zellen. Der Abbau der Partikel findet laut Bisht et al. in den Endosomen statt. Hier werden die Kalziumphosphat-Nanopartikel durch den sauren pH-Wert der Endosomen (pH=5) aufgelöst (Bisht et al., 2005). Das bei diesem Abbau freigesetzte Kalzium könnte für die hohe *in vitro* Toxizität des Nanogel®-Materials verantwortlich sein (siehe Toxizitätstests). Da Kalzium als „second messenger Molekül“, an zahlreichen zellulären Prozessen wie etwa die Zellmigration oder Proliferation beteiligt ist, findet eine deutliche Beeinflussung der Zellen statt. Nach dem derzeitigen Wissensstand werden die Kalziumphosphat-DNA-Nanopartikel nach der Adsorption an die Zellmembran über Endozytose aufgenommen. Dieser Vorgang wird durch Experimente von Sokolova et al. mit markierten Kalziumphosphat-Nanopartikeln gestützt, welche durch ein rot fluoreszierendes Tetramethylrhodaminisothiocyanat-Rinderserumalbumin markiert

wurden. Mittels Fluoreszenz- und konfokaler Mikroskopie kann so der Weg des Kalziumphosphat-Nanopartikels in die Zellen beobachtet werden (Sokolova, Kovtun, Heumann, & Epple, 2007). Tetramethylrhodaminisothiocyanat-Rinderserumalbumin allein d.h. ohne CaP-Nanopartikel wird nicht in die Zellen aufgenommen (Sokolova et al., 2007). Dies widerlegt -zusammen mit den TEM-Aufnahmen der Zellen ohne Albuminzusatz- die These, dass das Albuminmolekül die Aufnahme der CaP-Partikel ermöglicht. Auch in Abwesenheit des Albuminmoleküls findet eine Aufnahme der CaP-Nanopartikel in die Zellen statt (vgl. TEM-Aufnahmen). Die Adsorption von Kalziumphosphat an das Albuminmolekül ist von verschiedenen Forschergruppen bestätigt worden (Triffitt & Owen, 1977; Zeng et al., 1999). Findet im vorliegenden Fall eine Adsorption des HSA-Moleküls an die Nanogel®-Partikel statt könnten die HSA-Moleküle über die Endozytose der CaP-Partikel ebenfalls ins Zellinnere transportiert werden.

Auswertung der Tierversuchsdaten

Die verwendete Methodik der Knochenmark-Aspiration mit anschließender Gewinnung von ovinen MSC konnte erfolgreich durchgeführt werden. Bei dem gewonnenen Zellmaterial handelt es sich nach Abschluss der Differenzierungsexperimente um ovine MSC mit einem sehr hohen osteogenen Potential (siehe Abbildung 103).

Um die isolierten Schaf-MSC für den Tierversuch in einer möglichst frühen Passage zu verwenden, wurden die Zellen in flüssigem N₂ eingefroren und erst wenige Tage vor dem Einsetzen des Knochenimplantats aufgetaut und in Kultur genommen. Nach dem Auftauvorgang und erneut nach einigen Tagen Kulturdauer wurde die Vitalität der Zellen überprüft. Der Einfrier- und Auftauvorgang hatte auf die Vitalität bzw. die

Proliferationsgeschwindigkeit der ovinen MSC keinen negativen Einfluss. Analoge Ergebnisse bezüglich der Zellvitalität eingefrorener MSC zeigen die Experimente von Haack-Sorensen oder Rhodes et al. (Haack-Sorensen, Bindslev, Mortensen, Friis, & Kastrup, 2007; Rhodes, Srivastava, Smith, & Longinotti, 2004). Durch die Überführung der Zellen in flüssigen N₂ konnte gewährleistet werden, dass die Zellen in einer sehr frühen und für alle Tiere synchronen Passage für den Tierversuch verwendet werden konnten.

Die Testung der besiedelten bzw. unbesiedelten Polyurethanschäume bzw. des Referenzgegenstandes Osteovit® unter Nutzung des Darmbeins (Tuber coxae) am Schaf konnte sehr gut durchgeführt werden. Die Applikation in diesen Situs bietet die Möglichkeit verschiedene Knochenersatzmaterialien von erheblicher Größe zu verwenden und in den spongiösen Knochen einzubringen. Die Polyurethan-Schäume ließen sich jedoch aufgrund der materialspezifischen Eigenschaften (in hohem Maße elastisch und komprimierbar) nur schlecht im Knochendefekt platzieren, da keinerlei Anpassung an den Defekt erfolgte.

Eine Studie von Willie et al. (Willie, Bloebaum, Bireley, Bachus, & Hofmann, 2004) untersuchte das Einwachsen von neuem Knochengewebe in poröse Implantate (welche in den distalen Femur von Schafen eingesetzt wurden). Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass das Einwachsen von neuem Knochengewebe beim Schaf nach dem gleichen Muster abläuft wie im Menschen- auch wenn gezeigt werden konnte, dass das Einwachsen im Vergleich zum humanen Modell im gleichen Zeitfenster deutlich schneller stattfindet (was auch auf den höheren Anteil an spongiösem Knochen im Schaf zurückzuführen sein könnte). Daher sollte das lange Zeitfenster im Tierversuch (bis zu 39 Wochen post operationem) ausreichend für eine vollständige Einheilung der Knochenimplantate sein. Es erfolgte aber keine

vollständige Regeneration der Defekte, lediglich eine geringe Mineralisierung in Form von Bereichen mit vermehrter Röntgendichte, die sich saumartig um den Defekt befanden (bei den Stammzell besiedelten PU-Schäumen etwas stärker ausgeprägt wie bei den unbesiedelten Knochenimplantaten). Diese röntgenologischen Veränderungen waren jedoch insgesamt von einer sehr geringen Ausprägung.

Synthetische Trägermaterialien als Knochenersatz

Ungeachtet der Zusammensetzung des jeweiligen Knochenersatzmaterials sollte es eine Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der MSC begünstigen um eine Frakturheilung (Knochenregeneration) zu ermöglichen (Petite H., 2000). Das implantierte Trägermaterial sollte zudem vaskularisiert werden, da die Osteogenese unbedingt eine gut-entwickelte Gefäßbildung erfordert (Marks et al., 1996). Bei den *in vitro* Versuchen des modifizierten Polyurethan-Schaums zeigte sich, dass das Material eine Proliferation der mesenchymalen Zellen unterstützt. Auch eine Differenzierung der Zellen zu Knochenzellen konnte kolorimetrisch und histologisch nachgewiesen werden. Die REM-Aufnahmen zeigen zudem, dass bereits nach 17 Tagen eine starke Mineralisierung eingesetzt hatte- in Form von abgelagerten Kalziumphosphat auf der Materialoberfläche. Die grundsätzliche Eignung des Materials für die Zellproliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung zeigen die Daten des Mikroarray-Experiments. Gene, welche diese zellulären Prozesse steuern wurden während der Kultivierung der Stammzellen auf dem Polyurethanmaterial hochreguliert. Gefärbte Materialdünnschnitte, die nach einer mehrtägigen Inkubation des Materials mit Zellen angefertigt wurden zeigen aber auch, dass wegen der fehlenden interkonnektierenden Porosität die Proliferation und Differenzierung der Zellen fast ausschließlich an der äußeren Oberfläche des Polyurethanschaums

stattfinden (siehe Abbildung 93). Dies führt auch dazu, dass die mechanischen Eigenschaften des synthetischen Trägermaterials Polyurethan, denen von nativem Knochen nicht annähernd entsprechen kann, da im Trägerinneren keine Mineralisierung und damit auch keine mechanische Verfestigung erfolgte. Die homogene Zellbesiedelung konnte auch nicht mit einer Variation der konventionellen Besiedelungstechnik (Besiedelung mit Kanüle bzw. Vakuumbesiedelung) erreicht werden. Die dünne mineralisierte Außenschicht (siehe Abbildung 96) führt zu keiner signifikanten Änderung der mechanischen Materialeigenschaften. So bleibt das PU-Knochenimplantat auch nach mehreren Monaten *in vivo* elastisch und dehnbar (siehe Abbildung 120 bis Abbildung 127). Da durch die hohe Elastizität des PU-Schaums auch eine Verschiebung des Materials im Defekt stattfindet („Herausgleiten“) und das Material nicht unmittelbar und stabil an dem Defekt anliegt kommt es zu keiner Knochenheilung. Röntgenologisch wurden dezente Unterschiede in der postoperativen Entwicklung zwischen dem nativen unbesiedelten Prüfgegenständen und den mit schafeigenen MSC-besiedelten Prüfgegenständen detektiert. Es erfolgte ausnahmslos eine Mineralisierung an den Randgebieten des Defekts, dies könnte zum einen auf die Besiedelungsmethode zurückzuführen sein (die Polyurethanschäume wurden ausschließlich oberflächlich besiedelt) sowie auf die allgemeine Angrenzung von physiologischen Knochen bzw. Knochenmark. Wie unter 1.3.5 beschrieben, sind die Hauptursachen für eine schlechte Knochenheilung eine unzureichende Blutzufuhr, eine schlechte Position der Fraktarenden zueinander, die Zwischenlagerung von Weichteilgewebe oder nekrotisches Knochengewebe zwischen Knochenfragmenten, eine ungenügende Ruhigstellung der Fraktarenden, eine Infektion, fortgeschrittenes Alter, systemische Erkrankungen (z.B. Diabetes) oder Drogenmissbrauch (Einhorn, 1995). Die Inzidenz von Frakturen beläuft sich auf

ca. 5,6 Mio Frakturen pro Jahr in den USA – in 5- 10% dieser Fälle kommt es zu einer verzögerten bzw. ausbleibenden Knochenheilung (Einhorn, 1995). Es ist deshalb von essentieller Bedeutung, dass bei einer Frakturheilung mit synthetischen Trägermaterialien eine Einsprossung von Gefäßen und so eine gute Vaskularisierung möglich ist bzw. durch eine entsprechend hohe Porosität des verwendeten Materials gefördert wird. Die mikroskopischen Aufnahmen des PU-Schaums bestätigen die geschätzte Porengröße von 50 bis 400 µm, die experimentellen Daten belegen aber, dass keine interkonnektierende Porosität vorliegt d.h. die Poren nicht ausreichend miteinander verbunden sind. Infolgedessen war kein Einwachsen der Zellen in das Material und eine damit verbundene Vaskularisierung bzw. osteogene Differenzierung mit einhergehender Verfestigung des Materials möglich. Bei den Testmaterialien aus Hydroxylapatit bzw. Tricalciumphosphat mit Kollagenzusatz bzw. den TriHA+-Würfeln konnte dagegen eine gute interkonnektierende Porosität beobachtet werden. Die elastischen Kollagen-/Mineralimplantate verfestigten sich nach der Zellbesiedelung. Nach einer osteogenen Differenzierungsphase der Zellen ändern sich die Materialeigenschaften grundlegend: die Elastizität nahm stark ab und das Material nahm durch die mineralischen Ablagerungen der Zellen an Festigkeit und Härte zu. Je länger hierbei die osteogene Differenzierung der Zellen durchgeführt wurde (siehe Abbildung 42), desto höher war der Materialanteil der irreversibel komprimiert wurde d.h. das Material war weniger elastisch und hat damit im Umkehrschluss an Festigkeit zugenommen.

Einsatz von Stammzellen bei der Knochenregeneration

Der Einsatz von Stammzellen –verschiedenen Ursprungs - hat sich in vielen Fällen als vielversprechender Ansatz für die Regeneration von Knochendefekten gezeigt.

Vielversprechende Zellkandidaten sind beispielsweise Knochenmarkstammzellen (BM-MSC), Stammzellen aus dem Periost oder der Nabelschnur oder auch aus dem Fruchtwasser. Hingegen zeigt der Einsatz von Stammzellen aus der Zahnpulpa oder der Zahnwurzelhaut oder Stammzellen, welche aus Fettgewebe isoliert wurden nur mäßige bis schlechte Ergebnisse (Robey, 2011). Der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen bei verschiedenen Krankheiten beinhaltet neben den zahlreichen bereits positiv in Studien belegten Effekten auch die Gefahr der Entartung der Zellen bzw. des tumorfördernden Potential dieser Zellen (Erdö et al., 2003; Fujikawa et al., 2005). Deshalb hat der Ursprung der mesenchymalen Stammzellen auch einen Einfluss auf deren Sicherheit am Patienten. Teratom-Bildung, ausgelöst durch humane embryonale Stammzellen, konnten bei der Transplantation dieser Zellen in den Hoden (Gertow et al., 2004), in die Nierenkapsel (Blum & Benvenisty, 2007), der Leber (Cooke, Stojkovic, & Przyborski, 2006), Hinterbeinmuskeln (Amit et al., 2003) und im subkutanen Raum (Cooke et al., 2006; Prokhorova et al., 2009) beobachtet werden. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen oder künstlich reprogrammierten Zellen (sog. IPS, induced pluripotent stem cells) sind die Risiken der Entartung bzw. der Teratom-Bildung bei der Verwendung adulter mesenchymaler Stammzellen minimal (de Sa Silva et al., 2012; Hentze et al., 2009). Der Einsatz von adulten Stammzellen sollte auch mit einer strikten Überprüfung dieser Zellen hinsichtlich der Morphologie, des Alters und der Funktionalität korrelieren (Oberflächenmarker, Seneszenz, Karyotyp, Differenzierungspotential). Laut den Minimalkriterien der „International Society for Cellular Therapy“ sollten die MSC positiv für die Oberflächenmarker CD105, CD73, und CD90 sein, und negativ für die Marker CD34, CD45, CD11a, CD19 und CD14 (Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005). Außerdem sollte eine Norm für die Kultivierung dieser Zellen erstellt und

eingehalten werden (hinsichtlich CO₂-Werts, O₂-Werts, Verzicht auf tierische Serumkomponenten, komplexe Medienzusammensetzung) um kontinuierlich gleichbleibende Kulturbedingungen zu ermöglichen. Die Verwendung tierischer Serumkomponenten bei der Kultivierung von MSCs für den Einsatz am Patienten, kann zu zahlreichen Problemen wie der Übertragung von Viren, Mykoplasmen oder Prionen führen. Außerdem kann die Inkorporation von tierischen Proteinen durch die MSCs zu allergischen Reaktionen führen (EL-Ensahsy et al., 2009). Bei den verschiedenen getesteten Alternativmedien ohne tierische Serumkomponenten schnitten viele Medienvarianten sehr gut ab (gute Proliferation bzw. Differenzierungsfähigkeit) und waren sogar dem FCS-haltigen Medium überlegen. Der Zusatz von 10% AB-Serum zum Medium bzw. verschiedene Konzentrationen an humanem Thrombozytenlysat zeigte sich als gute Alternative zu FCS-haltigem Medium. Auch der regulierende bzw. mildernde Effekt von MSC auf Entzündungsprozesse sind eine Chance diesen Zelltypus auf Knochentransplantaten einzusetzen. MSC interagieren mit verschiedenen Zellen des Immunsystems und führen so zu einer Hemmung bzw. einem Abschwächen der inflammatorischen Reaktion (Aggarwal & Pittenger, 2005). Desweiteren konnte eine positive, gegenseitige Beeinflussung von MSCs und endothelialen Vorläuferzellen nachgewiesen werden in Experimenten zur Kapillarbildungsfähigkeit (siehe Abbildung 27 und Abbildung 29) und in Experimenten zur mineralischen Ablagerung (siehe Abbildung 31) –diese positive, gegenseitige Beeinflussung der beiden Zelltypen wurde auch durch Experimente weiterer Forschergruppen bestätigt (Aguirre et al., 2010; Seebach et al., 2010).

Zusammenfassung

Die Inzidenzrate von schlecht- bzw. nicht heilenden Knochendefekten nach Verletzungen, operativen Eingriffen, postonkologischen Interventionen oder Infektionen hat in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen. Knochendefekte bleiben eine Herausforderung für Chirurgen und Wissenschaftler durch die begrenzte Verfügbarkeit von autologem Knochengewebe für die Reparatur dieser Defekte. Methoden zur Gewebezüchtung ermöglichen die Erzeugung enormer Mengen an Knochengewebe mit nur wenigen autologen Zellen als Ausgangsmaterial. Mesenchymale Stammzellen (MSC) besitzen das Potential sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (z.B. auch zu Knochenzellen). Ziel dieser Studie war das Potential autologer MSC bei der Reparatur eines bestimmten Knochendefekts im Schafmodell zu untersuchen unter Verwendung eines neuen Knochenersatzmaterials in Kombination mit Zellen (Tissue-Engineering Methode). Zunächst wurden mehrere Knochenersatzmaterialien *in vitro* getestet. Einige von ihnen erfüllten die Kriterien eines „guten Knochenersatzmaterials“, aber einige zeigten sehr schlechte Versuchsergebnisse. Eines der Testmaterialien (Nanogel®) war sogar zytotoxisch. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Nanogel®- Kalziumphosphatpartikel in die Zellen inkorporiert wurden. Dieser Aufnahmeprozess in die Zelle könnte für die Toxizität des Materials verantwortlich sein durch eine Freisetzung von intrazellulärem Kalzium. Ein anderes getestetes Knochenersatzmaterial, ein Polyurethanschaum (Fa. Aesculap) zeigte in den *in vitro* Versuchen vielversprechende Ergebnisse und wurde in einem *in vivo* Schafmodell weiter analysiert. Autologe Schaf-MSC wurden von vier Schafen isoliert, *in vitro* expandiert und mittels Differenzierungsexperimente (zu Adipozyten,

Chondrozyten und Osteozyten) als Stammzellen (MSC) charakterisiert. Jeder Polyurethanschaum wurde mit 6 Millionen schafeigenen Zellen besiedelt und in das entsprechende Tier reimplantiert. Den Schafen wurden knöcherne Defekte (ca. 15 mm im Durchmesser) in das Darmbein (Tuber coxae) platziert und diese Knochendefekte wurden entweder mit den unbesiedelten PU-Schäumen oder durch zellbesiedelte Schäume aufgefüllt. Röntgenologische Aufnahmen zeigen die Bildung von neuer Knochensubstanz v. a. auf den Polyurethanschäumen in Kombination mit MSC. In Abwesenheit von MSC wurde nur eine sehr geringfügige Knochenneubildung beobachtet. Obwohl die *in vitro*-Ergebnisse der PU-Schäume vielversprechend waren, war der *in vivo*-Einsatz im Schaf über einen Zeitraum von mehreren Monaten nicht erfolgreich. Wie schon die *in vitro* Vorversuche gezeigt haben, fehlt dem Polyurethanschaum die interkonnektierende Porosität d.h. die Zellen wachsen und differenzieren sehr gut auf dem Material (gute Biokompatibilität und gute Matrixbildung), das Wachstum und die osteogene Matrixbildung können aber nur oberflächlich auf dem Material beobachtet werden. Bereiche im Materialinneren können von den Zellen aufgrund der in sich geschlossenen Poren nicht besiedelt werden. Abgesehen von der fehlenden interkonnektierenden Porosität zeigte das Polyurethanmaterial zudem große Nachteile bei der *in vivo*-Anwendung. Der Polyurethanschaum ist durch eine hohe Flexibilität und Elastizität gekennzeichnet, so bereitete es große Schwierigkeiten den PU- Schaum im Defekt stabil zu platzieren (ohne ein Herausgleiten des Materials). Vermutlich wäre das Material durch seine speziellen Materialeigenschaften (flexibel, elastisch) ein vielversprechender Kandidat für eine andere Anwendung in der regenerativen Medizin z.B. als Meniskustransplantat (hier sollten die Materialeigenschaften besser mit den *in vivo* - Anforderungen übereinstimmen als für den Einsatz als Knochenersatzmaterial).

Summary

The rate of occurrence of delayed- and non-union bone defects after trauma, or surgical interventions or infections has increased continuously over the past years. Bone defects remain a major challenge to surgeons and scientists due to limited availability of autologous bone tissue to repair these defects. Tissue-engineering techniques can generate enormous amounts of bone tissue using only a small number of autologous cells. Bone Marrow Stromal Cells (MSC) have the potential of multi-lineage differentiation (e.g. to osteocytes). The objective of this study was to investigate the potential of using autologous MSCs to repair a distinct bone defect in sheep with a tissue-engineering approach. In a first step different scaffolds were tested *in vitro*. Some of them well-matched the criteria of a good bone scaffold, but some failed. One of the materials, Nanogel® was even toxic. TEM-Experiments showed that the Nanogel® Calciumphosphate-particles were incorporated into the cells. This process might lead to an intoxication of the cell due to the calcium freed from the cells in the process. Another material, a polyurethan foam (produced by Aesculap), showed great potential in the *in vitro* tests and was thus further analyzed in an *in vivo* sheep model. Autologous MSCs were isolated from 4 sheep respectively and were expanded *in vitro* and confirmed to be mesenchymal stem cells by differentiation along the adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineage. 6 Mio MSC then were placed on a polyurethan-scaffold and re-implanted into the individual animals. Defects (about 15 mm in diameter) were created in sheep (tuber coxae) and the bone defects were either repaired with the polyurethan-scaffolds alone or in combination with MSC. X-ray photographs revealed the formation of new bone tissue when the polyurethan scaffolds were used in combination with MSC. In the absence

of cells only a very slight formation of new bone tissue could be observed. Even though the *in vitro* results of the polyurethan scaffold were promising and showed a great potential of the material, the *in vivo* application which was tested for some months in a sheep model showed poor results. The material as such had a great biocompatibility (which resulted in a high cell proliferation *in vitro*) and the MSCs were able to differentiate to bone cells. But the cells could only proliferate and differentiate on the surface of the PU-foam due to the lack of end-to-end connectivity of the pores. Additionally in the *in vivo* application the mechanical properties of the material showed disadvantages. The polyurethan foam is highly flexible and elastic and thereby it proved to be difficult to fixate it in the bone defect so that it could not easily slip out of the defect. It is likely that this material is a promising candidate for another kind of regenerative application *in vivo* for example as a meniscus transplant (in this case the material characteristics should correspond to the *in vivo* application much better than for the bone defect).

Anhang

1.40 Übersicht FACS-Antikörper

Tabelle 47: Übersicht der getesteten Antikörper zur Bestimmung der hMSC Identität.

Antikörper	Bezugsquelle
IgG1 (Phycoerythrin (PE) konjugiert), Mouse	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD19 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD29 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD31 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD34 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD44 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD45 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD56 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD73 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD80 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD86 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD90 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD106 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD117 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD119 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD130 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD133 (PE), Mouse-Anti-Human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD144 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD146 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD166 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD271 (PE), Mouse-Anti-Human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

CD273 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD274 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
HLA-A,B,C (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
HLA G ec + ic (PE), Mouse-Anti-Human	EXBIO, Praha, Tschechische Republik
VEGFR2 (PE), Mouse-Anti-Human	R&D Systems, Minneapolis, USA
IgG1 (PE), Mouse	Bio Legend, San Diego, USA
W8B2 / TNAP (PE), Mouse-Anti-Human	Bio Legend, San Diego, USA
IgG2a (PE), Mouse	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD10 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD14 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD59 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD71 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD140a (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD140b (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD243 (PE), Mouse-Anti-Human	Chemicon (Millipore Corporation), Billerica, USA

Tabelle 48: Weitere Antikörper (Färbungen).

IgG3 (PE), Mouse	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
SSEA-4 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IgM (PE), Mouse	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
SSEA-1 / CD15 (PE), Mouse-Anti-Human	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Mouse Anti-Kollagen 1 Monoclonal Antibody (unconjugated)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Goat- Anti-Mouse-IgG (H+L)– Alexa488	Invitrogen/ life technologies, Grand Island, USA

1.41 Verbrauchsmaterialien

Combitips Plus® Biopur	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pasteur Capillary Pipettes	Wilhelm Ulbrich, Bamberg, Deutschland
Pipettenspitzen Safe Seal Tips Premium	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Costar® Stripette® 2ml, 5ml, 10ml, 25ml & 50ml	Corning Incorporated, NY, USA
Cryo.s™ 2ml, Innengewinde, mit Stehkreuz	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
LightCycler Capillaries 20µl	Roche, Basel, Schweiz
Safe-Lock Tubes 1,5ml & 2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
15ml Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50ml Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
125ml Flasche PET quadratisch, steril	Nalgene Nunc International, NY, USA
Multidishes mit Deckel, steril, 6-/24-/48-/96-Well	Nunc, Waltham, USA
Polystyrol Probengefäß mit PE-Schraubkappe, steril	Electron-Nord /VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellkultureinsätze für 24-Well	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Zellkulturflaschen, Filter, steril, 25cm²/75cm²/185cm²	Nunc, Waltham, USA
C-Chip Neubauer-Zählkammer DHC-N01	Digital Bio Technology, East Sussex, England
Culture Inserts in µ-Dish bzw. for self insertion	ibidi, Martinsried, Deutschland
Einmalpinzetten, steril, einzeln verpackt	Servoprax GmbH, Wesel, Deutschland
Einmalspritzen Injekt	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Filterpapier	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Glasobjektträger normal & SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Microlance Kanülen	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Miraject® PL Super, stumpfe Applikationskanüle	Hager & Werken, Duisburg, Deutschland
Skalpell	B.Braun, Melsungen, Deutschland
S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Syringe-Filter Minisart 0,2µm steril	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
µ-Slide Angiogenesis	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Matrigel	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zellschaber	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Zellsieb 40µm, 70µm & 100µm	BD Falcon, Franklin Lakes, USA

1.42 Chemikalien/ Reagenzien / Medien

Albumin 20% (200g/l)	Biotest, Dreieich, Deutschland
Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Aceton, reinst	Universitätsapotheker Tübingen, Deutschland
Alcianblau 8GX 1%ig	Universitätsapotheker Tübingen, Deutschland
Alizarin Red S	Sigma, Steinheim, Deutschland
Alkalische Phosphatase Kit	Sigma, Steinheim, Deutschland
Alpha-MEM	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Ammoniumhydroxid-Lösung 10%	Universitätsapotheker Tübingen, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Annexin-V-FLUO Staining Kit	Roche, Basel, Schweiz
Chloroform zur Analyse	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Dexamethasone	Sigma, Steinheim, Deutschland
Diff-Kit Adipo (Ind.+Maint.) + Single-Quots	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Diff-Kit Chondro + Single-Quots	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz

Dimethylsulfoxid getrocknet (max. 0,025% H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
ECGS-Lyophilisat	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
EGM-2 Bullet Kit	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Essigsäure 10% (v/v)	Universitätsapotheker Tübingen, Deutschland
Essigsäure 100%, wasserfrei, pro analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut pro analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FCS)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Formaldehyd -Lösung 4%,	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 10%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 37%	Universitätsapotheker Tübingen, Deutschland
Hematoxylin nach Gill III	Merck, Darmstadt, Deutschland
human TGF- β 3 (5 μ g)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
humanes AB-Serum	Blutbank Tübingen, Deutschland
humanes A-Serum	Blutbank Tübingen, Deutschland
humanes Thrombozytenlysat	Blutbank Tübingen, Deutschland
Iso-2-Propanol pro analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbic Acid 2-Phosphate	Sigma, Steinheim, Deutschland
Lymphoflot	BioRad, München, Deutschland
McCoy's 5A modified Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Methanol pro analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oil Red O	Sigma, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz

SafraninO 0,1% in Wasser	Universitätsapotheker Tübingen, Deutschland
Trypanblau 0,5% (w/v)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin 10x	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
β-Glycerolphosphat disodium salt hydrate	Sigma, Steinheim, Deutschland
7-AAD Staining Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

1.43 Klein- und Großgeräte

Absaugpumpe	Vaccubrand, Wertheim, Deutschland
Absorptionsphotometer anthos ht3	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Abzug nach DIN 12924 Teil 1	Wesemann Laboreinrichtungen GmbH, Syke, Deutschland
AccuChek Compact Plus + Teststreifenrolle	Roche, Basel, Schweiz
Autoklav 5050 ELV	Tuttnauer Europe, Breda, Niederlande
Autoklav KSG 119	KSG Sterilisatoren GmbH, Eichenau, Deutschland
Brut- & Hypoxieschrank CB210 E3	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank HERAccl	Heraeus, Hanau, Deutschland
CASY Cell Counter TT	Innovatis / Roche, Basel, Schweiz
CellDyn Ruby System	Abbott Laboratories, Illinois, USA
CryoStorage System Base Unit 24K	tec-lab, Taunusstein, Deutschland
DIGI-BLOCK® JR	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dispenser ceramus 2-10ml	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Durchflusszytometer FACScan	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Rasterelektronenmikroskop TM-1000, Tablet Microscope	Hitachi Ltd. Corporation, Tokio, Japan
Freezing Container “ Mr. Frosty”, Nalgene	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland

Inkubations- / Inaktivierungsbad 1008	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kühlschrank 4°C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland
Mikroskop Axiovert200 mit AxioCam ICc3	Zeiss, Jena, Deutschland
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter pH540 GLP	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten Research variabel	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Plattenschüttler UNIMAX 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
REAX top Vortex	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Spectrophotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tiefkühlschrank -80°C MDF-U73V	SANYO Electric Co., Moriguchi, Japan
Trockenschrank SUT 6200	Heraeus, Hanau, Deutschland
Waage AS200	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 46R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Zwick-Zugprüfmaschine Typ: Z020	Zwick Roell, Ulm, Deutschland
Z®RP Bioreaktor 6000 H R&D	Zellwerk GmbH, Berlin, Deutschland

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro-
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ad libitum	nach Belieben
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
Asc	Ascorbinsäure
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone Marrow derived Stem Cells
BSA	Bovines Serum Albumin
Buprenorphin	Analgetikum
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Ca^{2+}	Kalzium
CD	Cluster of differentiation
CFU-F	Colony-forming unit fibroblasts
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CSD	Critical size defekt
CT	Computer Tomographie
d	Tag

d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Media
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dorsal	Rückenwärts, am Rücken gelegen
ECFC	Endotheliale Kolonie bildende Zelle
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement (Fa.BD)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
et al.	et alii
FCS	Fetal Calf Serum / Fetales Kälberserum
GA-1000	30 mg/ml Gentamicin und 15 µg/ml Amphotericin (Fa. Lonza)
GLP	Gute Laborpraxis
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hydroxylapatit
hämostyptisch	blutstillend
HA-TCP	Hydroxylapatit-Tricalciumphosphat
HCL	Salzsäure
HEGF	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor
hFGF	Humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor
HLA	Human Leukocyte Antigen
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle
HPL	Humanes Plättchenlysate

HSA	Humanes Serum Albumin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheiten
IGF-1	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor 1
IKET	Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin
In situ	Lat. „am Ort“
In vitro	Lat. „im Glas“
In vivo	Lat. für im Lebendigen
ISO	International Organization for Standardization
Kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
L	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molarität
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	Millimol
MW	Mittelwert
N₂	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
O₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
oMSC	Ovine mesenchymal stem cells (Schafstammzellen)
OP	Operation

P	Passage
P/S	Penicillin Streptomycin- Lösung
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain reaction
PD	Populationsverdopplungen
PL	Plättchenlysat
Post operationem	Nach der Operation
prae operationem	Vor der Operation
PU-Schaum	Polyurethan Schaum
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
sagittal	Parallel zur Mittelachse des Körpers
Sulfamethoxypyridazin	Antibakterielles Agenz, Einsatz in Tiermedizin
Tab.	Tabelle
TCP	Tricalciumphosphat
transkortikal	durch die Knochenhaut hindurch
Tuber coxae	Darmbein
U	Unit (Einheit)
VEGF	Vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor
ventral	Bauchseits, am Bauch gelegen
ventromedial	Zum Bauch und zur Körpermitte hin gelegen
z.B.	Zum Beispiel

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin am Uniklinikum Tübingen (AG Siegel) unter der Leitung von Prof. Dr. H. Northoff angefertigt. Für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Unterstützung möchte ich mich gerne bei Prof. Dr. H. Northoff bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danke ich für die wissenschaftlichen Hilfestellungen und die hilfreichen Anregungen und Ideen.

Hr. Dr. Georg Siegel danke ich für das Korrekturlesen und die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Für das Anfertigen der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen möchte ich mich besonders bei Isabelle Braun (Fa. Translumina, Hechingen) bedanken. Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Jasmin Stein (Universität Tübingen, AG Duszenko) für die Hilfestellungen bei der Anfertigung der transmissionselektronischen Aufnahmen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Hr. Dr. R. Kehlbach und Hr. Dr. R. Klaffschenkel für die stetige Hilfsbereitschaft in allen praktischen und theoretischen Fragen.

Für die Hilfe bei den FACS-Analysen möchte ich Ursula Hermanutz-Klein danken.

Bei Nadine Söldner möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag und der Zellkultur bedanken. Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Siegel für die freundschaftliche und tolle Arbeitsatmosphäre die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, 105(4): 1815-1822.
- Aguilar-Vazquez, R., Carballo-Molina, O. A., Collazo-Navarrete, O., Guerrero-Rangel, M., Saucedo-Campos, A. D., Barrera-Lechuga, P., Lopez-Marure, R., & Caceres-Cortes, J. R. 2008. [Osteogenesis of human vascular endothelial cells in culture]. **Rev Invest Clin**, 60(6): 496-501.
- Aguirre, A., Planell, J. A., & Engel, E. 2010. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, 400(2): 284-291.
- Aicher, W. K., Bühring, H.-J., Hart, M., Rolauffs, B., Badke, A., & Klein, G. 2011. Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells—potential and pitfalls. **Advanced drug delivery reviews**, 63(4): 342-351.
- Alexander, D., Schafer, F., Olbrich, M., Friedrich, B., Buhring, H. J., Hoffmann, J., & Reinert, S. 2010. MSCA-1/TNAP selection of human jaw periosteal cells improves their mineralization capacity. **Cell Physiol Biochem**, 26(6): 1073-1080.
- Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., & Itskovitz-Eldor, J. 2003. Human feeder layers for human embryonic stem cells. **Biology of reproduction**, 68(6): 2150-2156.
- An, H. S., Lynch, K., & Toth, J. 1995. Prospective comparison of autograft vs. allograft for adult posterolateral lumbar spine fusion: differences among freeze-dried, frozen, and mixed grafts. **J Spinal Disord**, 8(2): 131-135.
- Arinzeh, T. L., Peter, S. J., Archambault, M. P., van den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A., & Kadiyala, S. 2003. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, 85(10): 1927-1935.
- Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L., & Davino, N. A. 1996. Complications of iliac crest bone graft harvesting. **Clin Orthop Relat Res**(329): 300-309.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., & Isner, J. M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, 275(5302): 964-966.
- Au, P., Tam, J., Fukumura, D., & Jain, R. K. 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. **Blood**, 111(9): 4551-4558.
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 8(3): 301-316.
- Basciano, L., Nemos, C., Foliguet, B., de Isla, N., de Carvalho, M., Tran, N., & Dalloul, A. 2011. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia

- promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. **BMC cell biology**, 12(1): 12.
- Baskin, D. S., Ryan, P., Sonntag, V., Westmark, R., & Widmayer, M. A. 2003. A prospective, randomized, controlled cervical fusion study using recombinant human bone morphogenetic protein-2 with the CORNERSTONE-SR allograft ring and the ATLANTIS anterior cervical plate. **Spine (Phila Pa 1976)**, 28(12): 1219-1224; discussion 1225.
- Beckmann, R., Tohidnezhad, M., Lichte, P., Wruck, C., Jahr, H., Pape, H., & Pufe, T. 2014. Aus alt mach neu. **Orthopade**, 43(4): 298-305.
- Bensaid, W., Oudina, K., Viateau, V., Potier, E., Bousson, V., Blanchat, C., Sedel, L., Guillemain, G., & Petite, H. 2005. De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model. **Tissue Eng**, 11(5-6): 814-824.
- Beresford, J. N., Joyner, C. J., Devlin, C., & Triffitt, J. T. 1994. The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. **Arch Oral Biol**, 39(11): 941-947.
- Besch, L., Bielstein, D., Schuckart, M., & Zenker, W. 1994. [Analysis of 55 post-traumatic pseudarthroses after tibial fracture]. **Zentralbl Chir**, 119(10): 702-705.
- Beutler, S., Regel, G., Pape, H., Machtens, S., Weinberg, A., Kreimeike, I., Jonas, U., & Tscherne, H. 1999. Extracorporeal shock wave therapy for delayed union of long bone fractures—preliminary results of a prospective cohort study. **Unfallchirurg**, 102(11): 839-847.
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, 2(4): 313-319.
- Bieback, K. 2013. Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures. **Transfus Med Hemother**, 40(5): 326-335.
- Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., & Klüter, H. 2009. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. **Stem Cells**, 27(9): 2331-2341.
- Bisht, S., Bhakta, G., Mitra, S., & Maitra, A. 2005. pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: highly efficient non-viral vector for gene delivery. **Int J Pharm**, 288(1): 157-168.
- Blatter, T. R., Dellling, G., Dalal, P. S., Toth, C. A., Balling, H., & Weckbach, A. 2002. Successful transpedicular lumbar interbody fusion by means of a composite of osteogenic protein-1 (rhBMP-7) and hydroxyapatite carrier: a comparison with autograft and hydroxyapatite in the sheep spine. **Spine (Phila Pa 1976)**, 27(23): 2697-2705.
- Blum, B., & Benvenisty, N. 2007. Clonal analysis of human embryonic stem cell differentiation into teratomas. **Stem Cells**, 25(8): 1924-1930.
- Boden, S. D., Martin, G. J., Jr., Morone, M. A., Ugbo, J. L., & Moskovitz, P. A. 1999. Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium

- phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. **Spine (Phila Pa 1976)**, 24(12): 1179-1185.
- Bosch, P., Musgrave, D. S., Lee, J. Y., Cummins, J., Shuler, T., Ghivizzani, T. C., Evans, T., Robbins, T. D., & Huard. 2000. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. **J Orthop Res**, 18(6): 933-944.
- Boulting, G. L., Kiskinis, E., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Wainger, B. J., Williams, D. J., Kahler, D. J., Yamaki, M., & Davidow, L. 2011a. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, 29(3): 279-286.
- Boulting, G. L., Kiskinis, E., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Wainger, B. J., Williams, D. J., Kahler, D. J., Yamaki, M., Davidow, L., Rodolfa, C. T., Dimos, J. T., Mikkilineni, S., MacDermott, A. B., Woolf, C. J., Henderson, C. E., Wichterle, H., & Eggan, K. 2011b. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. **Nat Biotechnol**, 29(3): 279-286.
- Boxall, S. A., & Jones, E. 2012. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. **Stem Cells Int**, 2012: 975871.
- Bruder, S. P., Fink, D. J., & Caplan, A. I. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem**, 56(3): 283-294.
- Bruder, S. P., Kraus, K. H., Goldberg, V. M., & Kadiyala, S. 1998. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **J Bone Joint Surg Am**, 80(7): 985-996.
- Calvert, J. W., Weiss, L. E., & Sundine, M. J. 2003. New frontiers in bone tissue engineering. **Clin Plast Surg**, 30(4): 641-648, x.
- Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, 9(5): 641-650.
- Choi, K. M., Seo, Y. K., Yoon, H. H., Song, K. Y., Kwon, S. Y., Lee, H. S., & Park, J. K. 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. **J Biosci Bioeng**, 105(6): 586-594.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162(1): 156-159.
- Chowdhury, E. H., Kunou, M., Nagaoka, M., Kundu, A. K., Hoshiba, T., & Akaike, T. 2004. High-efficiency gene delivery for expression in mammalian cells by nanoprecipitates of Ca-Mg phosphate. **Gene**, 341: 77-82.
- Coelho, M. J., & Fernandes, M. H. 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. **Biomaterials**, 21(11): 1095-1102.
- Cooke, M., Stojkovic, M., & Przyborski, S. 2006. Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site. **Stem cells and development**, 15(2): 254-259.
- Cooper, L. F., Harris, C. T., Bruder, S. P., Kowalski, R., & Kadiyala, S. 2001. Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. **J Dent Res**, 80(1): 314-320.

- Cowan, C. M., Shi, Y. Y., Aalami, O. O., Chou, Y. F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Contag, C. H., Wu, B., & Longaker, M. T. 2004. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. **Nat Biotechnol**, 22(5): 560-567.
- Critser, P. J., & Yoder, M. C. 2010. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. **Curr Opin Organ Transplant**, 15(1): 68-72.
- Cuomo, A. V., Virk, M., Petrigliano, F., Morgan, E. F., & Lieberman, J. R. 2009. Mesenchymal stem cell concentration and bone repair: potential pitfalls from bench to bedside. **J Bone Joint Surg Am**, 91(5): 1073-1083.
- Damien, C. J., & Parsons, J. R. 1991. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **J Appl Biomater**, 2(3): 187-208.
- De Kok, I. J., Drapeau, S. J., Young, R., & Cooper, L. F. 2005. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 20(4): 511-518.
- De Long, W. G., Jr., Einhorn, T. A., Koval, K., McKee, M., Smith, W., Sanders, R., & Watson, T. 2007. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. **J Bone Joint Surg Am**, 89(3): 649-658.
- de Sa Silva, F., Almeida, P. N., Rettore, J. V., Maranduba, C. P., de Souza, C. M., de Souza, G. T., Zanette Rde, S., Miyagi, S. P., Santos Mde, O., Marques, M. M., & Maranduba, C. M. 2012. Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. **J Biomed Biotechnol**, 2012: 758102.
- de Wynter, E. A., Emmerson, A. J., & Testa, N. G. 1999. Properties of peripheral blood and cord blood stem cells. **Baillieres Best Pract Res Clin Haematol**, 12(1-2): 1-17.
- Desai, B. M. 2007. Osteobiologics. **Am J Orthop (Belle Mead NJ)**, 36(4 Suppl): 8-11.
- Diederichs, S., Röker, S., Marten, D., Peterbauer, A., Scheper, T., van Griensven, M., & Kasper, C. 2009. Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z® RP platform. **Biotechnology progress**, 25(6): 1762-1771.
- DiGirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R., & Prockop, D. J. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **Br J Haematol**, 107(2): 275-281.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 8(4): 315-317.
- Dreifke, M. B., Ebraheim, N. A., & Jayasuriya, A. C. 2013. Investigation of potential injectable polymeric biomaterials for bone regeneration. **J Biomed Mater Res A**, 101(8): 2436-2447.
- Einhorn, T. A. 1995. Enhancement of fracture-healing. **J Bone Joint Surg Am**, 77(6): 940-956.

- EL-Ensahsy, H. A., Abdeen, A., Abdeen, S., Elsayed, E. A., EL Demellawy, M., Shereef, E., & Abdallah, A. 2009. Serum concentration effects on the kinetics and metabolism of HeLa-S3 cell growth and cell adaptability for successful proliferation in serum free medium. **World Applied Sciences Journal**, 6(5): 608-615.
- English, K., & Wood, K. J. 2013. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 3(5): a015560.
- Eppler, M. 2003. **Biomaterialien und Biomineralisation**: Teubner Verlag.
- Erdö, F., Bührle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Föcking, M., Küstermann, E., Kolossov, E., & Hescheler, J. 2003. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, 23(7): 780-785.
- Erices, A., Conget, P., & Minguell, J. J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, 109(1): 235-242.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, 9(6): 669-676.
- Folkman, J., & D'Amore, P. A. 1996. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell**, 87(7): 1153-1155.
- Folkman, J., & Ingber, D. 1992. Inhibition of angiogenesis. **Semin Cancer Biol**, 3(2): 89-96.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., & Keiliss-Borok, I. V. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, 17(4): 331-340.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, 4(5): 267-274.
- Friedlaender, G. E., Perry, C. R., Cole, J. D., Cook, S. D., Cierny, G., Muschler, G. F., Zych, G. A., Calhoun, J. H., LaForte, A. J., & Yin, S. 2001. Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the Treatment of Tibial Nonunions A Prospective, Randomized Clinical Trial Comparing rhOP-1 with Fresh Bone Autograft*. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, 83(1_suppl_2): 151-S158.
- Fujikawa, T., Oh, S.-H., Pi, L., Hatch, H. M., Shupe, T., & Petersen, B. E. 2005. Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. **Am J Pathol**, 166(6): 1781-1791.
- Gan, Y., Dai, K., Zhang, P., Tang, T., Zhu, Z., & Lu, J. 2008. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. **Biomaterials**, 29(29): 3973-3982.
- Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W., & Perlingeiro, R. C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. **Blood**, 109(4): 1743-1751.

- Garrido, C. A., Lobo, S. E., Turibio, F. M., & Legeros, R. Z. 2011. Biphasic calcium phosphate bioceramics for orthopaedic reconstructions: clinical outcomes. **Int J Biomater**, 2011: 129727.
- Gazdag, A. R., Lane, J. M., Glaser, D., & Forster, R. A. 1995. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. **J Am Acad Orthop Surg**, 3(1): 1-8.
- Gebhart, M., & Lane, J. 1991. A radiographical and biomechanical study of demineralized bone matrix implanted into a bone defect of rat femurs with and without bone marrow. **Acta Orthop Belg**, 57(2): 130-143.
- Gertow, K., Wolbank, S., Rozell, B., Sugars, R., Andäng, M., Parish, C. L., Lmreh, M. P., Wendel, M., & Åhrlund-Richter, L. 2004. Organized development from human embryonic stem cells after injection into immunodeficient mice. **Stem Cells Dev**, 13(4): 421-435.
- Giannoni, P., Mastrogiacomo, M., Alini, M., Pearce, S. G., Corsi, A., Santolini, F., Muraglia, A., Bianco, P., & Cancedda, R. 2008. Regeneration of large bone defects in sheep using bone marrow stromal cells. **J Tissue Eng Regen Med**, 2(5): 253-262.
- Glowacki, J. 1998. Angiogenesis in fracture repair. **Clin Orthop Relat Res**(355 Suppl): S82-89.
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M. S. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76(1): 333-337.
- Gollwitzer, H., Brandner, H., & Gloeck, T. 2006. Extrakorporale Stoßwellentherapie bei Knochenheilungsstörungen. **Trauma und Berufskrankheit**, 8(3): 142-152.
- Gollwitzer, H., Gloeck, T., Roessner, M., Langer, R., Horn, C., Gerdesmeyer, L., & Diehl, P. 2013. Radial Extracorporeal Shock Wave Therapy (rESWT) Induces New Bone Formation< i> in vivo</i>: Results of an Animal Study in Rabbits. **Ultrasound in medicine & biology**, 39(1): 126-133.
- Gomez-Barrena, E., Rosset, P., Lozano, D., Stanovici, J., Ermthaller, C., & Gerbhard, F. 2014. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. **Bone**.
- Grant, D. S., Kleinman, H. K., Leblond, C. P., Inoue, S., Chung, A. E., & Martin, G. R. 1985. The basement-membrane-like matrix of the mouse EHS tumor: II. Immunohistochemical quantitation of six of its components. **Am J Anat**, 174(4): 387-398.
- Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A., & Prockop, D. J. 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem**, 329(1): 77-84.
- Griffin, M., Iqbal, S. A., & Bayat, A. 2011. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. **J Bone Joint Surg Br**, 93(4): 427-434.
- Guillot, P. V., Gotherstrom, C., Chan, J., Kurata, H., & Fisk, N. M. 2007. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. **Stem Cells**, 25(3): 646-654.

- Haack-Sorensen, M., Bindslev, L., Mortensen, S., Friis, T., & Kastrup, J. 2007. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use. **Cytotherapy**, 9(4): 328-337.
- Hall, P. A., & Watt, F. M. 1989. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. **Development**, 106(4): 619-633.
- Hallfeldt, K. K., Kessler, S., Puhlmann, M., Mandelkow, H., & Schweiberer, L. 1992. [The effect of various sterilization procedures on the osteoinductive properties of demineralized bone matrix]. **Unfallchirurg**, 95(7): 313-318.
- Hatzokos, I., Stavridis, S. I., Iosifidou, E., Karataglis, D., & Christodoulou, A. 2011. Autologous bone marrow grafting combined with demineralized bone matrix improves consolidation of docking site after distraction osteogenesis. **J Bone Joint Surg Am**, 93(7): 671-678.
- Hausman, M. R., Schaffler, M. B., & Majeska, R. J. 2001. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. **Bone**, 29(6): 560-564.
- Hauzeur, J. P., & Gangji, V. 2010. Phases 1-3 clinical trials using adult stem cells in osteonecrosis and nonunion fractures. **Stem Cells Int**, 2010: 410170.
- Haynesworth, S. E., Baber, M. A., & Caplan, A. I. 1996. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. **J Cell Physiol**, 166(3): 585-592.
- Heary, R. F., Schlenk, R. P., Sacchieri, T. A., Barone, D., & Brotea, C. 2002. Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. **Neurosurgery**, 50(3): 510-516; discussion 516-517.
- Hendrich, C., Franz, E., Waertel, G., Krebs, R., & Jager, M. 2009. Safety of autologous bone marrow aspiration concentrate transplantation: initial experiences in 101 patients. **Orthop Rev (Pavia)**, 1(2): e32.
- Hentze, H., Soong, P. L., Wang, S. T., Phillips, B. W., Putti, T. C., & Dunn, N. 2009. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. **Stem Cell Research**, 2(3): 198-210.
- Hernandez, D. A., Townsend, L. E., Uzieblo, M. R., Haan, M. E., Callahan, R. E., Bendick, P. J., & Glover, J. L. 2000. Human endothelial cell cultures from progenitor cells obtained by leukapheresis. **American Surgeon**, 66(4): 355-359.
- Hernigou, P., & Homma, Y. 2012. Tissue bioengineering in orthopedics. **Clin Cases Miner Bone Metab**, 9(1): 21-23.
- Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F., & Rouard, H. 2005. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. **J Bone Joint Surg Am**, 87(7): 1430-1437.
- Hernigou, P., Poignard, A., Zilber, S., & Rouard, H. 2009. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. **Indian J Orthop**, 43(1): 40-45.
- Hirschi, K. K., Ingram, D. A., & Yoder, M. C. 2008. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 28(9): 1584-1595.

- Hofmann, N. A., Reinisch, A., & Strunk, D. 2009. Isolation and large scale expansion of adult human endothelial colony forming progenitor cells. **J Vis Exp**(32).
- Hollinger, J. O., Schmitt, J. M., Buck, D. C., Shannon, R., Joh, S. P., Zegzula, H. D., & Wozney, J. 1998. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. **J Biomed Mater Res**, 43(4): 356-364.
- Hollister, S. J., & Murphy, W. L. 2011. Scaffold translation: barriers between concept and clinic. **Tissue Eng Part B Rev**, 17(6): 459-474.
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., & Keating, A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 7(5): 393-395.
- Hulbert, S. F., Young, F. A., Mathews, R. S., Klawitter, J. J., Talbert, C. D., & Stelling, F. H. 1970. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **J Biomed Mater Res**, 4(3): 433-456.
- Ingram, D. A., Mead, L. E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M. J., Gilley, D., & Yoder, M. C. 2004. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. **Blood**, 104(9): 2752-2760.
- Iyer, S. S., & Rojas, M. 2008. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. **Expert Opin Biol Ther**, 8(5): 569-581.
- Jager, M., Hernigou, P., Zilkens, C., Herten, M., Li, X., Fischer, J., & Krauspe, R. 2010. Cell therapy in bone healing disorders. **Orthop Rev (Pavia)**, 2(2): e20.
- Jager, M., Jelinek, E. M., Wess, K. M., Scharfstadt, A., Jacobson, M., Kevy, S. V., & Krauspe, R. 2009. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. **Curr Stem Cell Res Ther**, 4(1): 34-43.
- Jenis, L. G., Wheeler, D., Parazin, S. J., & Connolly, R. J. 2002. The effect of osteogenic protein-1 in instrumented and noninstrumented posterolateral fusion in rabbits. **Spine J**, 2(3): 173-178.
- Jerosch J., Bader A., Uhr G. 2002. **Knochen- curasan Taschenatlas spezial**.
- Jiao, F., Wang, J., Dong, Z.-l., Wu, M.-j., Zhao, T.-b., Li, D.-d., & Wang, X. 2012. Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. **Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")**, 14(4): 324-333.
- Johnsson, R., Stromqvist, B., & Aspenberg, P. 2002. Randomized radiostereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 Volvo Award in clinical studies. **Spine (Phila Pa 1976)**, 27(23): 2654-2661.
- Jorgenson, S. S., Lowe, T. G., France, J., & Sabin, J. 1994. A prospective analysis of autograft versus allograft in posterolateral lumbar fusion in the same patient. A minimum of 1-year follow-up in 144 patients. **Spine (Phila Pa 1976)**, 19(18): 2048-2053.
- Kabak, S., Halici, M., Tuncel, M., Avsarogullari, L., & Karaoglu, S. 2004. Treatment of midclavicular nonunion: comparison of dynamic compression plating and low-contact dynamic compression plating techniques. **Journal of shoulder and elbow surgery**, 13(4): 396-403.

- Kalfas, I. H. 2001. Principles of bone healing. **Neurosurg Focus**, 10(4): E1.
- Kandziora, F., Pflugmacher, R., Scholz, M., Schnake, K., Lucke, M., Schroder, R., & Mittlmeier, T. 2001. Comparison between sheep and human cervical spines: an anatomic, radiographic, bone mineral density, and biomechanical study. **Spine (Phila Pa 1976)**, 26(9): 1028-1037.
- Kasten, P., Beyen, I., Niemeyer, P., Luginbuhl, R., Böhner, M., & Richter, W. 2008. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. **Acta Biomater**, 4(6): 1904-1915.
- Kavlock, K. D., Pechar, T. W., Hollinger, J. O., Guelcher, S. A., & Goldstein, A. S. 2007. Synthesis and characterization of segmented poly(esterurethane urea) elastomers for bone tissue engineering. **Acta Biomater**, 3(4): 475-484.
- Kawate, K., Yajima, H., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Sugimoto, K., Ohmura, T., Kobata, Y., Shigematsu, K., Kawamura, K., Tamai, K., & Takakura, Y. 2006. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. **Artif Organs**, 30(12): 960-962.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., & Bieback, K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, 24(5): 1294-1301.
- Khan, Y., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G., & Laurencin, C. T. 2008. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. **J Bone Joint Surg Am**, 90 Suppl 1: 36-42.
- Kilborn, S. H., Trudel, G., & Uthoff, H. 2002. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. **Contemp Top Lab Anim Sci**, 41(5): 21-26.
- Kim, H. D., Wozney, J. M., & Li, R. H. 2004. Characterization of a calcium phosphate-based matrix for rhBMP-2. **Methods Mol Biol**, 238: 49-64.
- Klawitter, J. J., Bagwell, J. G., Weinstein, A. M., & Sauer, B. W. 1976. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. **J Biomed Mater Res**, 10(2): 311-323.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., & Martin, G. R. 1982. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. **Biochemistry**, 21(24): 6188-6193.
- Knoblich, J. A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. **Cell**, 132(4): 583-597.
- Kolbe, M., Xiang, Z., Dohle, E., Tonak, M., Kirkpatrick, C. J., & Fuchs, S. 2011. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. **Tissue Eng Part A**, 17(17-18): 2199-2212.
- Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R., & Quarto, R. 2000. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous

- hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*, 49(3): 328-337.
- Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., & Lawley, T. J. 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol*, 107(4): 1589-1598.
- Kuner, E., Berwarth, H., & Lücke, S. 1996. Behandlungsprinzipien bei aseptischen Pseudarthrosen. *Orthopade*, 25(5): 394-404.
- Kuroda, Y., & Dezawa, M. 2014. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec*, 297(1): 98-110.
- Laffargue, P., Hildebrand, H. F., Rtaimate, M., Frayssinet, P., Amoureux, J. P., & Marchandise, X. 1999. Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects. *Bone*, 25(2 Suppl): 55S-58S.
- Lako, M., Trounson, A. O., & Daher, S. 2011. Law, Ethics, Religion, and Clinical Translation in the 21st Century—A Conversation with Cinzia Rota. *Stem Cells*, 29(1): 1-2.
- Laurencin, C., Khan, Y., & El-Amin, S. F. 2006. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*, 3(1): 49-57.
- Laurie, S. W., Kaban, L. B., Mulliken, J. B., & Murray, J. E. 1984. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg*, 73(6): 933-938.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringden, O. 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 31(10): 890-896.
- Lee, S. J., & Atala, A. 2013. Scaffold technologies for controlling cell behavior in tissue engineering. *Biomed Mater*, 8(1): 010201.
- Li, C. M., Ho, Y. R., & Liu, Y. C. 2001. Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: a case report. *J Formos Med Assoc*, 100(5): 350-351.
- Li, T., & Wu, Y. 2011. Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. *Bone Marrow Res*, 2011: 353878.
- Lin, Y., Wang, T., Wu, L., Jing, W., Chen, X., Li, Z., Liu, L., Tang, W., Zheng, X., & Tian, W. 2007. Ectopic and in situ bone formation of adipose tissue-derived stromal cells in biphasic calcium phosphate nanocomposite. *J Biomed Mater Res A*, 81(4): 900-910.
- Lind, M., Deleuran, B., Thestrup-Pedersen, K., Soballe, K., Eriksen, E. F., & Bunger, C. 1995. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS*, 103(2): 140-146.
- Liu, Y., Teoh, S. H., Chong, M. S., Lee, E. S., Mattar, C. N., Randhawa, N. K., Zhang, Z. Y., Medina, R. J., Kamm, R. D., Fisk, N. M., Choolani, M., & Chan, J. K. 2012. Vasculogenic and osteogenesis-enhancing potential of human umbilical cord blood endothelial colony-forming cells. *Stem Cells*, 30(9): 1911-1924.

- Livingston, T. L., Gordon, S., Archambault, M., Kadiyala, S., McIntosh, K., Smith, A., & Peter, S. J. 2003. Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*, 14(3): 211-218.
- Lu, C., Miclau, T., Hu, D., Hansen, E., Tsui, K., Puttlitz, C., & Marcucio, R. S. 2005. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res*, 23(6): 1300-1307.
- Lyons, F. G., Al-Munajjed, A. A., Kieran, S. M., Toner, M. E., Murphy, C. M., Duffy, G. P., & O'Brien, F. J. 2010. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials*, 31(35): 9232-9243.
- Mandarino, M. P., & Salvatore, J. E. 1958. Polyurethane polymer (ostamer): its use in fractured and diseased bones; experimental results. *Surg Forum*, 9: 762-765.
- Manso, M. C., & Wassal, T. 2010. A 10-year longitudinal study of 160 implants simultaneously installed in severely atrophic posterior maxillas grafted with autogenous bone and a synthetic bioactive resorbable graft. *Implant Dent*, 19(4): 351-360.
- Martinez, C., Hofmann, T. J., Marino, R., Dominici, M., & Horwitz, E. M. 2007. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*, 109(10): 4245-4248.
- Martini, L., Fini, M., Giavaresi, G., & Giardino, R. 2001. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med*, 51(4): 292-299.
- Mastrogriacomo, M., Muraglia, A., Komlev, V., Peyrin, F., Rustichelli, F., Crovace, A., & Cancedda, R. 2005. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res*, 8(4): 277-284.
- Matsushima, A., Kotobuki, N., Tadokoro, M., Kawate, K., Yajima, H., Takakura, Y., & Ohgushi, H. 2009. In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate. *Artif Organs*, 33(6): 474-481.
- Mavropoulos, E., Costa, A. M., Costa, L. T., Achete, C. A., Mello, A., Granjeiro, J. M., & Rossi, A. M. 2011. Adsorption and bioactivity studies of albumin onto hydroxyapatite surface. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 83(1): 1-9.
- Mayr-Wohlfart, U., Fiedler, J., Gunther, K. P., Puhl, W., & Kessler, S. 2001. Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitute materials. *J Biomed Mater Res*, 57(1): 132-139.
- McCormack, D., Lane, H., & McElwain, J. 1996. The osteogenic potential of extracorporeal shock wave therapy, An in-vivo study. *Irish journal of medical science*, 165(1): 20-22.
- Miyazaki, M., Tsumura, H., Wang, J. C., & Alanay, A. 2009. An update on bone substitutes for spinal fusion. *Eur Spine J*, 18(6): 783-799.
- Morishita, T., Honoki, K., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Matsushima, A., & Takakura, Y. 2006. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three

- cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. **Artif Organs**, 30(2): 115-118.
- Morrey, B., & Wiedeman Jr, G. P. 1980. Complications and long-term results of ankle arthrodeses following trauma. **J Bone Joint Surg Am**, 62(5): 777-784.
- Morrison, S. J., & Kimble, J. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, 441(7097): 1068-1074.
- Müller, A. M., Hermanns, M., Skrzynski, C., Nesslinger, M., Müller, K.-M., & Kirkpatrick, C. J. 2002. Expression of the Endothelial Markers PECAM-1, vWf, and CD34 in Vivo and in Vitro. **Experimental and molecular pathology**, 72(3): 221-229.
- Muschler, G. F., Nakamoto, C., & Griffith, L. G. 2004. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **J Bone Joint Surg Am**, 86-A(7): 1541-1558.
- Nakahara, H., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. 1991. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. **J Orthop Res**, 9(4): 465-476.
- Nather, A., David, V., Teng, J. W., Lee, C. W., & Pereira, B. P. 2010. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. **ANNALS Academy of Medicine Singapore**, 39(8): 599.
- Nather A., O. H. J. C., and Aziz Z. 2005. **Bone Grafts and Bone Substitutes- Basic Science and Clinical Application**: World Scientific Publishing
- Newman, E., Turner, A. S., & Wark, J. D. 1995. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. **Bone**, 16(4 Suppl): 277S-284S.
- Niemeyer, P., Seckinger, A., Simank, H. G., Kasten, P., Sudkamp, N., & Krause, U. 2004. [Allogenic transplantation of human mesenchymal stem cells for tissue engineering purposes: an in vitro study]. **Orthopade**, 33(12): 1346-1353.
- Nuss, K. M., Auer, J. A., Boos, A., & von Rechenberg, B. 2006. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. **BMC Musculoskelet Disord**, 7: 67.
- Nuss, K. M., & von Rechenberg, B. 2008. Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics. **Open Orthop J**, 2: 66-78.
- Osborn, J. F., & Newesely, H. 1980. The material science of calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**, 1(2): 108-111.
- Ouyang, H. W., Cao, T., Zou, X. H., Heng, B. C., Wang, L. L., Song, X. H., & Huang, H. F. 2006. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects. **Transplantation**, 82(2): 170-174.
- Petite H., V. V., Bensaïd W., Meunier A., de Pollak C., Bourguignon M., Oudina K., Sedel L., and Guillemain G. 2000. Tissue-engineered bone regeneration. **Nature Biotechnology**, 18: 5.
- Phillips F.M., C. G., Emery S.E., and Bohlman H.H. 1997. Anterior Cervical Pseudarthrosis. **Spine**, 22(14): 5.

- Pilz, G. A., Ulrich, C., Ruh, M., Abele, H., Schafer, R., Kluba, T., Buhning, H. J., Rolauffs, B., & Aicher, W. K. 2011. Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. ***Stem Cells Dev***, 20(4): 635-646.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. ***Science***, 284(5411): 143-147.
- Pochampally, R. 2008. Colony forming unit assays for MSCs. ***Methods Mol Biol***, 449: 83-91.
- Porter, R. M., Huckle, W. R., & Goldstein, A. S. 2003. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. ***J Cell Biochem***, 90(1): 13-22.
- Posner, A. S. 1969. Crystal chemistry of bone mineral. ***Physiol Rev***, 49(4): 760-792.
- Pountos, I., Georgouli, T., Kontakis, G., & Giannoudis, P. V. 2010. Efficacy of minimally invasive techniques for enhancement of fracture healing: evidence today. ***Int Orthop***, 34(1): 3-12.
- Prokhorova, T. A., Harkness, L. M., Frandsen, U., Ditzel, N., Schröder, H. D., Burns, J. S., & Kassem, M. 2009. Teratoma formation by human embryonic stem cells is site dependent and enhanced by the presence of Matrigel. ***Stem cells and development***, 18(1): 47-54.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., & Marcacci, M. 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. ***N Engl J Med***, 344(5): 385-386.
- Raschke, M., & Gasch, A. 2012. Verzögerte Frakturheilung. ***Trauma und Berufskrankheit***, 14(1): 85-89.
- Rasini, V., Dominici, M., Kluba, T., Siegel, G., Lusenti, G., Northoff, H., Horwitz, E. M., & Schafer, R. 2013. Mesenchymal stromal/stem cells markers in the human bone marrow. ***Cytotherapy***, 15(3): 292-306.
- Ravaglioli, A., Krajewski, A., Celotti, G. C., Piancastelli, A., Bacchini, B., Montanari, L., Zama, G., & Piombi, L. 1996. Mineral evolution of bone. ***Biomaterials***, 17(6): 617-622.
- Redler, I., Brown, G. G., Jr., & Treckel, W. V. 1960. Polymer osteosynthesis. ***South Med J***, 53: 329-334.
- Rehman, I., Smith, R., Hench, L. L., & Bonfield, W. 1995. Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy. ***J Biomed Mater Res***, 29(10): 1287-1294.
- Reichardt, A., Polchow, B., Shakibaei, M., Henrich, W., Hetzer, R., & Lueders, C. 2013. Large scale expansion of human umbilical cord cells in a rotating bed system bioreactor for cardiovascular tissue engineering applications. ***The open biomedical engineering journal***, 7: 50.

- Rhodes, N. P., Srivastava, J. K., Smith, R. F., & Longinotti, C. 2004. Heterogeneity in proliferative potential of ovine mesenchymal stem cell colonies. **J Mater Sci Mater Med**, 15(4): 397-402.
- Rickard, D. J., Kassem, M., Hefferan, T. E., Sarkar, G., Spelsberg, T. C., & Riggs, B. L. 1996. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. **J Bone Miner Res**, 11(3): 312-324.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, 386(6626): 671-674.
- Robey, P. G. 2011. Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). **Tissue Eng Part B Rev**, 17(6): 423-430.
- Rodan, S. B., Imai, Y., Thiede, M. A., Wesolowski, G., Thompson, D., Bar-Shavit, Z., Shull, S., Mann, K., & Rodan, G. A. 1987. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. **Cancer Res**, 47(18): 4961-4966.
- Rompe, J.-D., Eysel, P., Hopf, C., Vogel, J., & Küllmer, K. 1997. Extracorporeal shock-wave treatment for disturbed bone healing A critical view. **Unfallchirurg**, 100(10): 845-849.
- Runkel, M., & Rommens, P. 2000. Pseudarthrosen. **Unfallchirurg**, 103(1): 51-63.
- Salamon, M. L., Althausen, P. L., Gupta, M. C., & Laubach, J. 2003. The effects of BMP-7 in a rat posterolateral intertransverse process fusion model. **J Spinal Disord Tech**, 16(1): 90-95.
- Saleh, F. A., Whyte, M., Ashton, P., & Genever, P. G. 2011. Regulation of mesenchymal stem cell activity by endothelial cells. **Stem Cells Dev**, 20(3): 391-403.
- Schell, H., Thompson, M. S., Bail, H. J., Hoffmann, J. E., Schill, A., Duda, G. N., & Lienau, J. 2008. Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results. **J Biomech**, 41(14): 3066-3072.
- Schlaeppli, J. M., Gutzwiller, S., Finkenzeller, G., & Fournier, B. 1997. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. **Endocr Res**, 23(3): 213-229.
- Schroder, H. C., Boreiko, O., Krasko, A., Reiber, A., Schwertner, H., & Muller, W. E. 2005. Mineralization of SaOS-2 cells on enzymatically (silicatein) modified bioactive osteoblast-stimulating surfaces. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 75(2): 387-392.
- Seebach, C., Henrich, D., Kähling, C., Wilhelm, K., Tami, A. E., Alini, M., & Marzi, I. 2010. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto β -TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. **Tissue Engineering Part A**, 16(6): 1961-1970.
- Selvaggi, T. A., Walker, R. E., & Fleisher, T. A. 1997. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. **Blood**, 89(3): 776-779.
- Shang, Q., Wang, Z., Liu, W., Shi, Y., Cui, L., & Cao, Y. 2001. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. **J Craniofac Surg**, 12(6): 586-593; discussion 594-585.

- Shepherd, B. R., Enis, D. R., Wang, F., Suarez, Y., Pober, J. S., & Schechner, J. S. 2006. Vascularization and engraftment of a human skin substitute using circulating progenitor cell-derived endothelial cells. *The FASEB journal*, 20(10): 1739-1741.
- Shors, E. C. 1999. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*, 30(4): 599-613.
- Simonds, R. J., Holmberg, S. D., Hurwitz, R. L., Coleman, T. R., Bottenfield, S., Conley, L. J., Kohlenberg, S. H., Castro, K. G., Dahan, B. A., Schable, C. A., & et al. 1992. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med*, 326(11): 726-732.
- Sittinger, M. Cell and Tissue Technologies. *Regenerative Medicine in Berlin-Brandenburg*: 44.
- Sokolova, V., Kovtun, A., Heumann, R., & Epple, M. 2007. Tracking the pathway of calcium phosphate/DNA nanoparticles during cell transfection by incorporation of red-fluorescing tetramethylrhodamine isothiocyanate-bovine serum albumin into these nanoparticles. *J Biol Inorg Chem*, 12(2): 174-179.
- Sorrentino, A., Ferracin, M., Castelli, G., Biffoni, M., Tomaselli, G., Baiocchi, M., Fatica, A., Negrini, M., Peschle, C., & Valtieri, M. 2008. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol*, 36(8): 1035-1046.
- Steiner, D., Lampert, F., Stark, G. B., & Finkenzeller, G. 2012. Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts. *J Orthop Res*, 30(10): 1682-1689.
- Stürmer, K. 1996. Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. *Orthopade*, 25(5): 386-393.
- Tan, S. L., Ahmad, T. S., Selvaratnam, L., & Kamarul, T. 2013. Isolation, characterization and the multi-lineage differentiation potential of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*, 222(4): 437-450.
- Tavassoli, M., & Crosby, W. H. 1968. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*, 161(3836): 54-56.
- Tay, B. K., Le, A. X., Heilman, M., Lotz, J., & Bradford, D. S. 1998. Use of a collagen-hydroxyapatite matrix in spinal fusion. A rabbit model. *Spine (Phila Pa 1976)*, 23(21): 2276-2281.
- Thompson F.R., S. M. Z. 1962. Polyurethane Polymer. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 44-A(No.8): 16.
- Tomford, W. W. 2000. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank*, 1(2): 105-109.
- Toolan, B. C. 2006. Current concepts review: orthobiologics. *Foot Ankle Int*, 27(7): 561-566.
- Traktuev, D. O., Prater, D. N., Merfeld-Clauss, S., Sanjeevaiah, A. R., Saadatzadeh, M. R., Murphy, M., Johnstone, B. H., Ingram, D. A., & March, K. L. 2009. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res*, 104(12): 1410-1420.
- Triffitt, J., & Owen, M. 1977. Preliminary studies on the binding of plasma albumin to bone tissue. *Calcified tissue research*, 23(1): 303-305.

- Trueta, J., & Buhr, A. J. 1963. The Vascular Contribution to Osteogenesis. V. The Vasculature Supplying the Epiphysial Cartilage in Rachitic Rats. **J Bone Joint Surg Br**, 45: 572-581.
- Tscherne, H. 1996. Pseudarthrosen. **Orthopade**, 25(5): 385-385.
- Uchida, A., Nade, S. M., McCartney, E. R., & Ching, W. 1984. The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. **J Bone Joint Surg Br**, 66(2): 269-275.
- Udagawa, N., Yamashita, T., Kobayashi, Y., & Takahashi, N. 2011. Identification of osteoclasts in culture. **Methods Mol Biol**, 690: 273-284.
- Ulrich, C., Abruzzese, T., Maerz, J. K., Ruh, M., Amend, B., Benz, K., Rolauffs, B., Abele, H., Hart, M. L., & Aicher, W. K. 2015. Human placenta-derived CD146-positive mesenchymal stromal cells display a distinct osteogenic differentiation potential. **Stem Cells Dev**.
- Urbich, C., Aicher, A., Heeschen, C., Dernbach, E., Hofmann, W. K., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. 2005. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 39(5): 733-742.
- Urist, M. R. 1965. Bone: formation by autoinduction. **Science**, 150(3698): 893-899.
- Urist, M. R., Silverman, B. F., Buring, K., Dubuc, F. L., & Rosenberg, J. M. 1967. The bone induction principle. **Clin Orthop Relat Res**, 53: 243-283.
- Urist, M. R., & Strates, B. S. 1970. Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins. **Clin Orthop Relat Res**, 71: 271-278.
- Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M., & Halleen, J. M. 2000. The cell biology of osteoclast function. **J Cell Sci**, 113 (Pt 3): 377-381.
- Vaccaro, A. R., Whang, P. G., Patel, T., Phillips, F. M., Anderson, D. G., Albert, T. J., Hilibrand, A. S., Brower, R. S., Kurd, M. F., Appannagari, A., Patel, M., & Fischgrund, J. S. 2008. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study. **Spine J**, 8(3): 457-465.
- Vaidya, R., Carp, J., Sethi, A., Bartol, S., Craig, J., & Les, C. M. 2007. Complications of anterior cervical discectomy and fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Eur Spine J**, 16(8): 1257-1265.
- Verdonk, P., Beaufils, P., Bellemans, J., Djian, P., Heinrichs, E. L., Huysse, W., Laprell, H., Siebold, R., & Verdonk, R. 2012. Successful treatment of painful irreparable partial meniscal defects with a polyurethane scaffold: two-year safety and clinical outcomes. **Am J Sports Med**, 40(4): 844-853.
- Verfaillie, C. M., Schwartz, R., Reyes, M., & Jiang, Y. 2003. Unexpected potential of adult stem cells. **Ann N Y Acad Sci**, 996: 231-234.
- Viateau, V., Guillemain, G., Bousson, V., Oudina, K., Hannouche, D., Sedel, L., Logeart-Avramoglou, D., & Petite, H. 2007. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. **J Orthop Res**, 25(6): 741-749.
- Vogel, J., Rompe, J.-D., Hopf, C., Heine, J., & Bürger, R. 1997. Die hochenergetische extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) in der

- Behandlung von Pseudarthrosen. **Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete**, 135(02): 145-149.
- Vogel, J. P., Szalay, K., Geiger, F., Kramer, M., Richter, W., & Kasten, P. 2006. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. **Platelets**, 17(7): 462-469.
- Voggenreiter, G., Ascherl, R., Fruh, H. J., Blumel, G., & Schmit-Neuerburg, K. P. 1995. [Preservation and sterilization of cortical bone--biomechanical studies of the rat]. **Unfallchirurg**, 98(2): 53-58.
- Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E., & Zetter, B. R. 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. **J Cell Biol**, 99(6): 2034-2040.
- Vunjak-Novakovic, G., & Radisic, M. 2004. Cell seeding of polymer scaffolds. **Methods Mol Biol**, 238: 131-146.
- Wang, J., Ye, Y., Tian, H., Yang, S., Jin, X., Tong, W., & Zhang, Y. 2011. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 412(1): 143-149.
- Wang, N., Fan, Y., Ni, P., Wang, F., Gao, X., Xue, Q., & Tang, L. 2008. High glucose effect on the role of CD146 in human proximal tubular epithelial cells in vitro. **J Nephrol**, 21(6): 931-940.
- Wiens, M., Wang, X., Schlossmacher, U., Lieberwirth, I., Glasser, G., Ushijima, H., Schroder, H. C., & Muller, W. E. 2010. Osteogenic potential of biosilica on human osteoblast-like (SaOS-2) cells. **Calcif Tissue Int**, 87(6): 513-524.
- Wilkins, R. M., Chimenti, B. T., & Rifkin, R. M. 2003. Percutaneous treatment of long bone nonunions: the use of autologous bone marrow and allograft bone matrix. **Orthopedics**, 26(5 Suppl): s549-554.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., & Smith, P. G. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. **Lancet**, 347(9006): 921-925.
- Williams, J. T., Southerland, S. S., Souza, J., Calcutt, A. F., & Cartledge, R. G. 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **Am Surg**, 65(1): 22-26.
- Willie, B. M., Bloebaum, R. D., Bireley, W. R., Bachus, K. N., & Hofmann, A. A. 2004. Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment. **J Biomed Mater Res A**, 69(3): 567-576.
- Winet, H. 1996. The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. **Bone**, 19(1 Suppl): 39S-57S.
- Winter, M., Griss, P., de Groot, K., Tagai, H., Heimke, G., von Dijk, H. J., & Sawai, K. 1981. Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**, 2(3): 159-160.
- Wintermantel E., H. S. W. 2002. **Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren**: Springer Verlag.

- Wu, C., Shih, C., Chen, W., & Tai, C. 1999. Effect of reaming bone grafting on treating femoral shaft aseptic nonunion after plating. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, 119(5-6): 303-307.
- Yamasaki, T., Yasunaga, Y., Ishikawa, M., Hamaki, T., & Ochi, M. 2010. Bone-marrow-derived mononuclear cells with a porous hydroxyapatite scaffold for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a preliminary study. **J Bone Joint Surg Br**, 92(3): 337-341.
- Yoder, M. C., Mead, L. E., Prater, D., Krier, T. R., Mroueh, K. N., Li, F., Krasich, R., Temm, C. J., Prchal, J. T., & Ingram, D. A. 2007. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. **Blood**, 109(5): 1801-1809.
- Young, H. E., Steele, T. A., Bray, R. A., Hudson, J., Floyd, J. A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., Duenzl, M., Lucas, P. A., & Black, A. C., Jr. 2001. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anat Rec**, 264(1): 51-62.
- Younger, E. M., & Chapman, M. W. 1989. Morbidity at bone graft donor sites. **J Orthop Trauma**, 3(3): 192-195.
- Yuan, J., Cui, L., Zhang, W. J., Liu, W., & Cao, Y. 2007. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, 28(6): 1005-1013.
- Yuan, Y., Chen, L. F., Zhang, S. Y., Wu, W., Chen, H., & Yan, X. W. 2005. [Differentiation of mesenchymal stem cells into cardio myogenic cells under the induction of myocardial cell lysate]. **Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**, 33(2): 170-173.
- Zamzam, M. M., Abak, A. A., Bakarman, K. A., Al-Jassir, F. F., Khoshhal, K. I., & Zamzami, M. M. 2009. Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts. **Int Orthop**, 33(5): 1353-1358.
- Zeng, H., Chittur, K. K., & Lacefield, W. R. 1999. Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. **Biomaterials**, 20(4): 377-384.
- Zhai, X., & Qiu, R. 2013. Regulations/Ethical Guidelines on Human Adult/Mesenchymal Stem Cell Clinical Trial and Clinical Translation, **Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation**: 279-313: Springer.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, 7(2): 211-228.